# PLANTA

## ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

**J. BONNER**-PASADENA, **E. BÜNNING**-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH
**H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK, **R. HARDER**-GÖTTINGEN
**W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

**WILHELM RUHLAND** UND **OTTO RENNER**

47. BAND, 1. HEFT

MIT 35 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 29. MÄRZ 1956)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Planta (Berl.)

*Preis DM 22.–*

# Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler.* Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".


---

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

*Professor Dr. Wilhelm Ruhland*, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67.*


**Springer-Verlag**

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 27901


---

47. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft


Seite

Reznik, H., und R. Urban, Die Aufnahme $^{14}C$-markierter Ligninbausteine in Fichtennadeln. Mit 9 Textabbildungen . . . . . 1

Moritz, O., und H. L. Rohn, Untersuchungen zum Problem der serologischen Fernreaktionen. Mit 1 Textabbildung . . . . . 16

Schumacher, W., und P. Lambertz, Über die Beziehungen zwischen der Stoffaufnahme durch Blattepidermen und der Zahl der Plasmodesmen in den Außenwänden . . . . . 47

Madan, Ch. L., Die Verteilung der freien Aminosäuren in der Pflanze und ihre Beeinflussung durch photoperiodische Induktion. (Untersuchungen an Kalanchoë Blossfeldiana). Mit 17 Textabbildungen . . . . . 53

Jeremias, K., Zur Physiologie der Frosthärtung. (Unter besonderer Berücksichtigung von Winterweizen.) Mit 3 Textabbildungen . . . . . 81

Frank, H., und O. Renner, Über Verjüngung bei Hedera helix L. Mit 5 Textabbildungen . . . . . 105

Planta, Bd. 47, S. 1—15 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

# DIE AUFNAHME $^{14}$C-MARKIERTER LIGNINBAUSTEINE IN FICHTENNADELN

Von

H. Reznik und R. Urban

Mit 9 Textabbildungen

*(Eingegangen am 19. Oktober 1955)*

## Einleitung

In einer jüngst veröffentlichten Untersuchung konnten Freudenberg, Reznik, Fuchs und Reichert (1955) unter anderem zeigen, daß mikroautoradiographische Verfahren bei der Erforschung des Verholzungsprozesses wertvolle Dienste leisten. Hatte sich in der zitierten Arbeit die mikroautoradiographische Analyse zunächst mit dem Einbau $^{14}$C-markierter Ligninbausteine in das sekundäre Holz junger Fichtensprosse beschäftigt, so erschien es nun als eine dem Botaniker besonders reizvolle Aufgabe, zu untersuchen, wie sich die verschiedenartigen Gewebe der Fichtennadel nach der Application der markierten Bausteine verhalten. Während das sekundäre Xylem der Coniferensproßachse, einförmig gebaut, relativ einfach zu übersehende Befunde zu zeitigen versprach, konnte von der Nadel, die nach Huber (1948) „einen einzigartigen Höhepunkt anatomischer Differenzierung auf kleinstem Raume" darstellt, ein gleiches Ergebnis nicht erwartet werden. Mit dem in der Nadel vorliegenden Differenzierungsmuster sollte auch eine Differenzierung der applizierten Radioaktivität parallel gehen. Wieweit sich diese Erwartung bestätigt, soll in der vorliegenden Mitteilung aufgezeigt werden.

Folgenden Fragen galt unsere besondere Aufmerksamkeit:

1. In welchen Geweben der Nadel werden die dargebotenen Ligninbausteine irreversibel ab- bzw. eingelagert?

2. In welchem Verhältnis sind sie dabei auf die einzelnen Gewebe verteilt?

3. Zeigen Nadeln in verschieden weiter Entfernung von der Applicationsstelle ein unterschiedliches Verhalten?

4. Verhalten sich die dargebotenen Verbindungen beim Einbau gleichartig oder bestehen statistisch gesicherte Unterschiede?

Schließlich hielten wir es für nützlich, das Ergebnis der historadiographischen Analyse insgesamt einer statistischen Prüfung zu unterziehen.

## Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an Nadeln von zwei- bis dreijährigen Fichtenbäumchen (Picea excelsa) vorgenommen. Den dekapitierten Seitenzweig-Enden wurde mit Hilfe eines speziellen Imbibitionsverfahrens (Freudenberg, Reznik, Fuchs u. Reichert 1955) folgende markierte Ligninbausteine appliziert:

1. D-Coniferin-Carbinol-$^{14}$C.
2. D-Coniferin-$\beta$-$^{14}$C.
3. D-Glucovanillin-Carbonyl-$^{14}$C.
4. D-Glucosyringaaldehyd-Carbonyl-$^{14}$C.

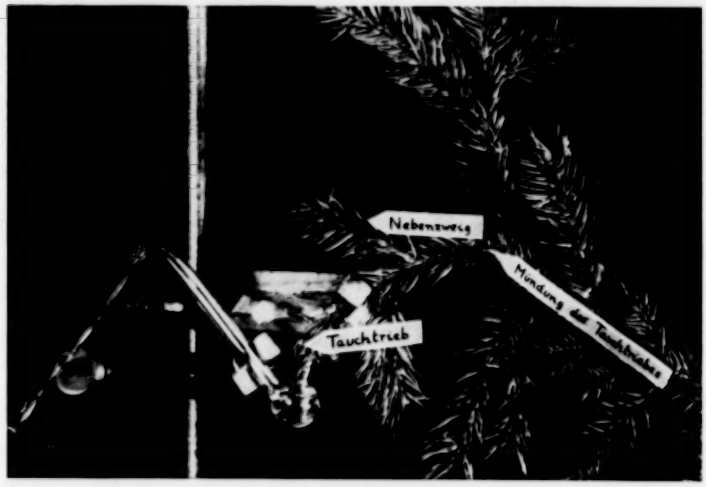


Abb. 1. Seitenzweige eines 4jährigen Fichtenbäumchens. Links: Applicationsgefäß mit dem radioaktiven Stoff

Das D-Coniferin lag in zwei unterschiedlichen Radiointensitäten vor. Die schwächer aktive Verbindung ist am mittelständigen ($\beta$-) C-Atom der Seitenkette markiert, die stärker aktive am primären Carbinol. Kontrollversuche mit den inaktiven Heterosiden zeigten, daß eine histologisch nachweisbare Beeinflussung des Stoffwechsels durch die R.A. höchstens an der Tauchtrieb-Spitze gegeben war (= Applicationsstelle, s. Abb. 1), zumal die Stärke der Radioaktivität sich in den für die tracer-Methode üblichen Grenzen hielt. Spezifische Aktivität: 0,1 bis 1 mC/mMol; 1—5 ml Lösung (0,5—1% g/v) pro Baum.

Die Nadeln für die Untersuchungsreihen wurden bei D-Coniferin und D-Glucovanillin nach 3 und 6 Tagen, bei D-Glucosyringaaldehyd nach 50 Tagen von den Bäumen abgenommen, und zwar jeweils:

a) am Tauchtrieb,
b) an dessen Insertionsstelle am Hauptsproß,
c) am ersten Nebenzweig des Tauchtriebes (Abb. 1).

Bei der Fixierung der Nadeln mußten wir uns mit der Anwendung von 70% Äthanol zufrieden geben. Andere in die Histologie eingeführte Gemische wie etwa FPA (Formaldehyd-Propionsäure-Alkohol) sind trotz ihrer vorzüglichen Fixierungseigenschaften ungeeignet, weil die Gefahr eines Reagierens mit den radioaktiven Verbindungen besteht. Die in Paraffin eingebetteten Nadeln wurden in Quer- und Längsschnitt-Serien geschnitten (5 $\mu$ Dicke). Die radioaktiven Schnittpräparate wurden auf Objektträger gebracht, die mit einem sehr dünnen Chrom-Alaun-Gelatine-Überzug (lt. Kodak-Anweisung) versehen waren. Um Färbeschwierigkeiten zu umgehen, wurden zu je einem gelatinierten Objektträger ein normaler Kontrollobjektträger mit entsprechenden Schnitten belegt (Färbung mit Hämatoxylin nach DELAFIELD).

*Das Aufbringen des „stripping-film":* Über die in Gebrauch stehenden mikroautoradiographischen Verfahren (contact method, mounting method, coating method, inverting method) finden sich in dem ausgezeichneten Sammelreferat von GROSS, BOGOROCH, NADLER u. LEBLOND (1951) nähere Angaben. Wir beschränkten uns auf die Anwendung des „coating"-Verfahrens, und zwar in der Form der „stripping-film"-Technik. Wir verwendeten Kodak Radioautographic Plates (Kodak Ltd. London). Die Dicke der photosensiblen Schicht betrug 5 $\mu$. Der „stripping-film" wurde bei sehr schwachem Grünlicht auf die gelatinierten Objektträger in der üblichen Weise (Kodak-Anleitung) „aufgezogen". Die Präparate wurden, nachdem sie in mit Silicagel beschickte Petrischalen gebracht worden waren, in lichtdichten Kästen 20—30 d bei einer Raumtemperatur von 10—15° C unter Trocknung exponiert. Zum Entwickeln benützten wir den Ilford-Entwickler I D 19 (0,45 g Metol, 28,8 g Natriumsulfit, 1,75 g Hydrochinon, 26,0 g Natriumcarbonat, 0,8 g Kaliumbromid, 200 ml aqua bidest. Diese Stammlösung haben wir jeweils vor Gebrauch mit aqua bidest. im Verhältnis 1:3 verdünnt). Entwicklungsdauer: 20 min. Nach Fixierung wurden die Präparate 1$^d$ getrocknet und schließlich in Caedax eingeschlossen.

*Auswertung.* Die Rolle der Radioautographie beschränkt sich nicht allein darauf, einen Überblick über die topographische Anordnung der Radioaktivität in Gewebeschnitten zu geben. Vielmehr erlauben es verschiedene analytische Methoden, auch quantitative bzw. semiquantitative Bestimmungen vorzunehmen. $^{14}C$ ist ein „weicher" $\beta^-$-Strahler (Maximalenergie 0,16 MeV). Wurden in einen Organismus nur geringe Quantitäten eines weichen Strahlers ($^3H$, $^{14}C$, $^{35}S$) eingebracht,

a) so ist die Elektronenspur-Analyse (Bahnspuranalyse) allen anderen Verfahren überlegen (SPERLING 1954, LEVI 1954). Für diesen Fall hat sich die Emulsion Ilford G 5 bewährt (Emulsionsdicke 20—25 $\mu$, mittlere Bahnspurlänge $^{14}C = 20\,\mu$). Bei Radio-Isotopen mit höherer Maximalenergie ($^{32}P = 1{,}71$ MeV, $^{89}Sr = 1{,}5$ MeV) liefert die Bahnspuranalyse unsichere Ergebnisse (Bahnspurlänge $^{32}P \sim 1400\,\mu$; $^{131}J \sim 200\,\mu$!).

b) Die in manchen Fällen angewendete densitometrische Analyse macht eine Trennung der Emulsion von dem darunter liegenden Gewebe erforderlich. Zur Berechnung der vom Gewebe ausgehenden totalen $\beta$-Strahlung aus Dichtemessungen verwendet man dann Vergleichskurven, die für $\beta$-Quellen von gleicher Energie und bekannter Intensität hergestellt worden sind. Die densitometrische Methode ist nur für schwache mikroskopische Vergrößerung geeignet. Für die Untersuchung histologischer und cytologischer

c) Details ist die Zählung der über einer Zelle bzw. Zellstruktur liegenden Silbergranula unter Benutzung eines Okularrasters angebracht. Dieses Verfahren ist zwar mühsam und zeitraubend, ergibt jedoch sehr brauchbare Resultate. Die vorliegenden Ergebnisse wurden nach der Granula-Zähl-Methode gewonnen. Elektronenspur-Analysen sind in Angriff genommen.

Nicht selten ist das Auffinden einer Bahnspur auch bei Normal-Emulsionen (Kodak Radioautographic Plates) möglich, und zwar dann, wenn der Austrittswinkel des Elektrons aus dem Organschnitt ein möglichst flacher ist (Abb. 2).

Die Zählung der Granula erfolgte mit Hilfe eines Okularrasters (Fläche eines Rasterfeldes: 56,25 $\mu^2$) unter Benützung eines Immersionsobjektivs (90 ×, Ap. 1,30). Die Resultate wurden statistisch geprüft.

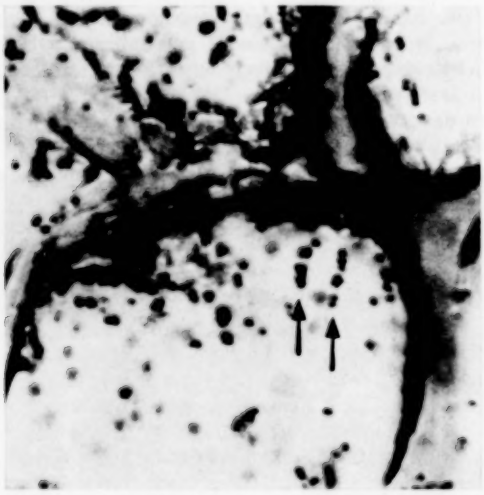

Abb. 2. Mikroautoradiogramm eines Nadelquerschnittes von Picea excelsa (Ausschnitt). Die Pfeile deuten auf zwei Elektronenspuren, die aus der Wand einer Endodermiszelle austreten. Vergr. 1250 ×

## Ergebnisse

Den Versuchsergebnissen der vorliegenden Arbeit seien zunächst Angaben vorausgeschickt, die für die Verteilung der einem 2jährigen Bäumchen dargebotenen Radioaktivität (R.A.) (D-Coniferin) Gültigkeit haben (Freudenberg, Reznik, Fuchs u. Reichert 1955). Setzen wir die eingebrachte Aktivität gleich 100%, so ist im Falle des D-Coniferins folgende Verteilung gegeben (Tabelle 1):

*Tabelle 1*

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 100% | → 60% Stamm | → | A | *50% Holz, meist unlöslich (Lignin) |
| | | → | B | *10% Rinde, Phloem, meist auswaschbar |
| | → 40% Nadeln | → | C | *30% auswaschbare Verbindungen |
| | | → | D | *10% unlösliche Verbindungen (Lignin?) |

Die mit * bezeichneten Werte beruhen auf Schätzungen.

Der Tabelle kann entnommen werden, daß von der gesamten in die Nadeln eingewanderten R.A. nur ein kleiner Teil in unlöslicher Form vorliegt. Die in der Nadel deponierten löslichen Verbindungen werden durch den Präparationsvorgang (Alkohol, Wasser) wieder ausgewaschen.

Es wurde nicht untersucht, in welchem Maße noch ungespaltenes Glucosid in der auswaschbaren Fraktion C vorhanden ist. Da uns auch mikroradiographische Ergebnisse im Hinblick auf die Lokalisation der auswaschbaren Fraktion C interessieren, sind wir neuerdings zur Gefriertrocknungsmethode übergegangen.

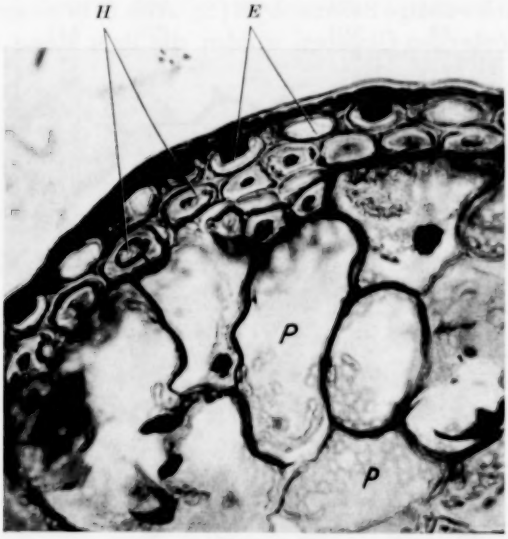


Abb. 3. Querschnitt durch die peripheren Gewebe einer Fichtennadel. *E* Epidermis, *H* Hypoderm, P Mesophyll-Parenchym. (Hämatoxylinfärbung, vergr. 450 ×)

Die vorliegenden Resultate beziehen sich also ausschließlich auf die in relativ geringer Konzentration vorhandene unlösliche Fraktion D, deren Lignincharakter, wie noch zu erläutern sein wird, durchaus nicht feststeht.

*Zur Anatomie der Fichtennadel.* Über die Histophysiologie der Coniferen-Nadel sind wir zuletzt durch Huber (1948) unterrichtet worden. Soweit Fragen der anatomischen Terminologie zur Diskussion stehen, folgen wir der Bezeichnungsweise des genannten Autors.

Die speziellen topographischen Verhältnisse der Fichtennadel seien an zwei Querschnitt-Mikrophotogrammen erläutert. Abb. 3 zeigt einen Ausschnitt aus den peripheren Geweben der Nadel. Auf die relativ großzellige mit großen Zellkernen ausgestattete Epidermis (*E*) folgt nach innen das mit dicken Sekundärwänden versehene sclerenchymatische Hypoderm (*H*). Die Hauptmasse der Nadel besteht aus dem Assimilationsparenchym (*P*) des Mesophylls. Armpalisaden sind nicht ausgebildet. An manchen Stellen grenzt das Parenchym direkt an die Epidermis. Harzgänge mit Sekret- und Scheidenzellen sind meist in Ein- oder Zweizahl vorhanden. Abb. 4 gibt die Verhältnisse im Zentral-

zylinder der Nadel wieder. Die Endodermis (*En*) umschließt das physiologisch bedeutsame Transfusionsgewebe, das in Transfusions-Tracheiden (*TT*) und Transfusions-Parenchym (*TP*) differenziert ist. Aus der Vielfalt der im Inneren des Zentralzylinders ausgebildeten Elemente wollen wir nur das Phloem (*Ph*), das Xylem (*X*) und das als Leitbündelbelag fungierende dickwandige Sclerenchym (*S*; Abb. 8) in unsere Betrachtung einbeziehen. Unter den Geweben wurden die ihrer Masse und Funktion

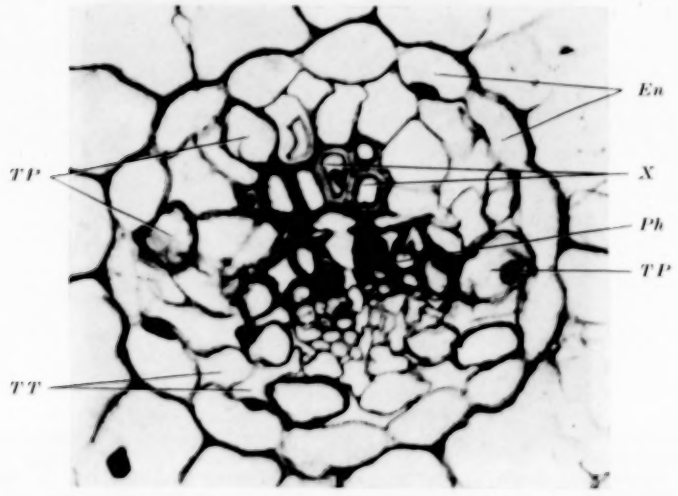


Abb. 4. Querschnitt durch den Zentralzylinder einer Fichtennadel. *En* Endodermis, *TT* Transfusions-Tracheiden, *TP* Transfusions-Parenchym, *Ph* Phloem, *X* Xylem. Vergr. 500 ×

nach bedeutendsten für die Zählung ausgewählt (Tabellen 2—5). Die in den Tabellen aufgeführten Werte stellen jeweils die Summe der Einzelwerte aus 25 sich entsprechenden Gewebebezirken dar, wobei je

Tabelle 2. *D-Coniferin-β-*$^{14}C$. Tauchtrieb ($U_1$/x), Nebenzweig ($U_2$/x)

| Präparat | Epidermis $\Sigma$ 25 | Hypoderm $\Sigma$ 25 | Parenchym Zellwand $\Sigma$ 25 | Parenchym Zellumen $\Sigma$ 25 | Endodermis $\Sigma$ 25 | Transfusionsparenchym $\Sigma$ 25 | Xylem $\Sigma$ 25 | Phloem $\Sigma$ 25 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $U_1$/4 | 81 | 131 | 580 | 222 | 203 | | 40 | 289 |
| $U_1$/2 | 82 | 85 | 445 | 188 | 236 | ~300 | 80 | 285 |
| $U_1$/1 | 52 | 68 | 428 | 139 | 180 | 256 | 66 | 322 |
| $U_1$/8 | 27 | 8 | 297 | 136 | 144 | | 15 | 190 |
| $U_2$/6 | 45 | 87 | 446 | 143 | 189 | 253 | 40 | 289 |
| $U_2$/3 | 81 | 131 | 560 | 186 | 217 | | 28 | 346 |
| $U_2$/2 | 83 | 121 | 561 | 225 | 204 | 144 | 50 | 331 |
| $U_2$/2 | 69 | 129 | 445 | 137 | 173 | 155 | 47 | 192 |

$\Sigma$ 25 = Granulazahl aus 25 Rasterfeldern (1 Feld = 56,25 $\mu^2$)

Tabelle 3. *D-Glucovanillin-Carbonyl-$^{14}C$.* Tauchtrieb ($U_6$/x), Nebenzweig ($U_4$/x)

| Präparat | Epidermis Σ 25 | Hypoderm Σ 25 | Parenchym Zellwand Σ 25 | Parenchym Zellumen Σ 25 | Endodermis Σ 25 | Transfusionsparenchym Σ 25 | Xylem Σ 25 | Phloem Σ 25 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $U_6$/2 | 38 | 70 | 297 | 100 | 173 | 156 | 25 | 278 |
| $U_6$/1 | 38 | 114 | 219 | 45 | 102 | 64 | 38 | 65 |
| $U_6$/3 | 17 | 27 | 192 | 21 | 76 | 76 | 43 | 95 |
| $U_6$/3 | 25 | 28 | 175 | 56 | 78 | 115 | 61 | 155 |
| $U_4$/2 | 136 | 178 | 624 | 251 | 347 | | 158 | 453 |
| $U_4$/2 | 188 | 121 | 560 | 193 | 292 | | 123 | 330 |
| $U_4$/8 | 80 | 118 | 364 | 134 | 105 | 299 | 38 | 202 |
| $U_4$/1 | 72 | 98 | 405 | 159 | 170 | 285 | 74 | 253 |

Σ 25 = Granulazahl aus 25 Rasterfeldern (1 Feld = 56,25 $\mu^2$)

Tabelle 4. *D-Glucovanillin-Carbonyl-$^{14}C$.* Tauchtrieb ($U_8$/x), Mündung des Tauchtriebes ($U_7$/x)

| Präparat | Epidermis Σ 25 | Hypoderm Σ 25 | Parenchym Zellwand Σ 25 | Parenchym Zellumen Σ 25 | Endodermis Σ 25 | Transfusionsparenchym Σ 25 | Xylem Σ 25 | Phloem Σ 25 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $U_8$/2 | 73 | 78 | 356 | 85 | 275 | 195 | 104 | 239 |
| $U_8$/1 | 77 | 72 | 303 | 85 | 152 | 151 | 60 | 241 |
| $U_8$/4 | 40 | 51 | 382 | 112 | 220 | 145 | 22 | 314 |
| $U_8$/3 | 49 | 36 | 259 | 102 | 155 | 141 | 20 | 208 |
| $U_7$/1 | 82 | 115 | 601 | 264 | 322 | 508 | 33 | 261 |
| $U_7$/4 | 64 | 57 | 419 | 181 | 288 | 247 | 142 | 440 |
| $U_7$/2 | 84 | 148 | 654 | 239 | 298 | 241 | 94 | 449 |
| $U_7$/3 | 53 | 117 | 354 | 174 | 210 | 332 | 52 | 331 |

Σ 25 = Granulazahl aus 25 Rasterfeldern (1 Feld = 56,25 $\mu^2$)

Tabelle 5. *D-Glucosyringaaldehyd-Carbonyl-$^{14}C$.* Tauchtrieb ($U_9$/x), Nebenzweig ($U_{10}$/x)

| Präparat | Epidermis Σ 25 | Hypoderm Σ 25 | Parenchym Zellwand Σ 25 | Parenchym Zellumen Σ 25 | Endodermis Σ 25 | Transfusionsparenchym Σ 25 | Xylem Σ 25 | Phloem Σ 25 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $U_9$/4 | 86 | 97 | 355 | 124 | 186 | 165 | 89 | 170 |
| $U_9$/5 | 86 | 115 | 305 | 89 | 173 | 183 | 112 | 173 |
| $U_9$/6 | 84 | 65 | 313 | 77 | 162 | 139 | 47 | 190 |
| $U_{10}$/1 | 109 | 122 | 379 | 63 | 323 | 644 | 235 | 496 |
| $U_{10}$/5 | 81 | 79 | 313 | 64 | 281 | 1010 | 80 | 334 |
| $U_{10}$/4 | 149 | 178 | 580 | 172 | 501 | 873 | 203 | 600 |

Σ 25 = Granulazahl aus 25 Rasterfeldern (1 Feld = 56,25 $\mu^2$)

5 zufallsmäßig ausgewählte Schnitte zur Auswertung herangezogen wurden. Die statistisch geprüfte Homogeneität sowohl der 5 homologen Gewebebezirke eines Schnittes als auch der 5 Schnitte untereinander

rechtfertigte die in den Tabellen vorgenommene vereinfachende Zusammenfassung. Der durch kosmische Strahlung und andere Agentien hervorgerufene Untergrundeffekt ist bei den Angaben bereits eliminiert, so daß die tabellierten Werte den reinen Organeffekt wiedergeben.

*Erläuterungen zu den Tabellen 2—5.* Aus dem vorliegenden Zahlenmaterial ergibt sich, daß die Zellwände des Mesophyll-Parenchyms durchwegs die größte Granuladichte aufweisen (Ausnahme: Zweig $U_{10}$,

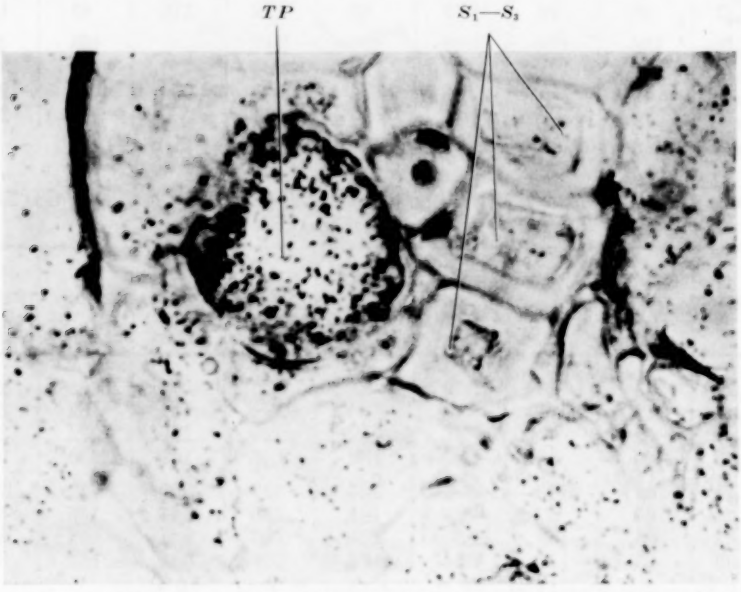


Abb. 5. Mikroautoradiogramm (Nadelquerschnitt) einer stark radioaktiven Zelle des Transfusionsparenchyms. Die rechts anschließenden Sclerenchymzellen ($S_1$—$S_3$) sind fast aktivitätsfrei. Vergr. 900 ×

s. unten). Setzen wir die durchschnittliche Granuladichte der Zellwand des Mesophyllparenchyms gleich 100%, so resultiert in den untersuchten Geweben folgende Verteilung der prozentualen Granuladichte:

| Parenchym-Zellwand | Phloem | Transfusionsparenchym | Endodermis |
|---|---|---|---|
| 100% | 70% | 58,1% | 52,9% |
| Parenchym-Zellumen | Hypoderm | Epidermis | Xylem |
| 34,2% | 23,4% | 18,3% | 18,2% |

Dieses Ergebnis bedeutet mit anderen Worten, daß gerade die normalerweise nicht oder nur schwach lignifizierten Gewebeelemente am intensivsten die Radioaktivität gespeichert haben. Welche Schlüsse aus diesem Phänomen zu ziehen sind, wird noch erörtert werden.

In Tabelle 5 ist eine auffällige Ausnahme aufgeführt. Man findet in den Nadeln ($U_{10/1,\ 5,\ 4}$; Nebenzweig) eines mit D-Glucosyringaaldehyd behandelten Bäumchens die parenchymatischen Zellen des Transfusions-

gewebes als Orte höchster Granuladichte. Die Unterschiede in der Verteilung der R.A. sind hier so groß, daß sie sich eindrucksvoll im Mikroautoradiogramm präsentieren lassen. Abb. 5 zeigt ein derartiges Aktivitätsnest, das sich eindeutig als Zelle des Transfusionsgewebes identifizieren läßt. Die benachbarten schwach aktiven Zellen (Endodermis, Transfusionstracheiden) zeigen nur sehr verschwommene Konturen, da die mikrophotographische Scharfeinstellung auf die optische Ebene der Granulaschicht des „stripping films" bezogen ist. Das so augenfällige

Abb. 6. Mikroautoradiogramm eines Aktivitätsnestes im Hypodermgewebe. Vergr. 900 ×

Abb. 7. Mikroautoradiogramm (Nadel quer) eines sehr stark aktiven Harzganges. Vergr. 350 ×

Resultat der Glucosyringaaldehyd-Serie ist insofern interessant, als dem Transfusionsgewebe bei der Regulierung der Saftströme in der Coniferen-Nadel besondere funktionelle Bedeutung zukommt (Huber 1948). Daß bei den Coniferin- und Glucovanillin-Serien die Rolle der Transfusionszellen als Umschlagszentralen weniger deutlich wird, führen wir darauf zurück, daß die zur Untersuchung kommenden Nadeln bereits 3 Tage nach der Application des tracers fixiert worden sind. Im Glucosyringaaldehyd-Versuch hingegen wurden Nadeln, die bereits seit 50 Tagen radioaktiv waren, analysiert. Hier konnte es auch dann entsprechend der Stoffwechselaktivität des Transfusionsgewebes zu einer Anhäufung der Ligninmonomeren kommen.

Diesen allgemeinen Resultaten sollen nun einige mehr singuläre Ergebnisse beigefügt werden: In sehr vereinzelten Fällen zeigten sich bestimmte Zellen oder Zellgruppen so extrem mit R.A. beladen („Aktivitätsnester"), daß eine Bestimmung der Granuladichte unmöglich war, da die Werte hoch über den in den Tabellen angegebenen Größenordnungen lagen. Abb. 6 zeigt ein derartiges Aktivitätsnest im Nadel-Hypoderm. Die Schwärzungsgranula sind mehr oder weniger

gleichmäßig über Zellwand und Lumen verteilt. Eine physiologische Deutung dieser Erscheinung müssen wir vorläufig zurückstellen. In einem weiteren Mikroautoradiogramm (Abb. 7) ist ein mit radioaktiven Produkten erfüllter Harzgang dargestellt. Auch die Epithelzellen nehmen dort an der Speicherung der R.A. teil. Die hier nachweisbare Strahlung könnte nach unseren Erfahrungen aus anderen Untersuchungen auf der Dimerisation der Bausteine zu Lignanen beruhen.

## Diskussion

Eine kritische Beleuchtung der Ergebnisse ist ohne Rücksichtnahme auf die Verholzungstopographie der Nadel, d. h. ohne vergleichende Anwendung von Holznachweisreaktionen nicht möglich. Wie die neuere

Abb. 8. UV-Mikrospektrophotogramm einiger Sclerenchymfasern (Cd-Linien: 2836,9 u. 2763,8 Å). Die Sekundär- und Tertiärlamelle der Sekundärwand sind fast ligninfrei. Vergr. 900 ×

Forschung gezeigt hat, gibt es aber bis auf den heutigen Tag keine einwandfreie histochemische Ligninreaktion! Der Anwendungsbereich des an sich vorzüglichen Mäuletestes ist auf die Angiospermen (Laubhölzer) beschränkt, da die Reaktion anscheinend nur auf die den Coniferen fehlende Syringyl-Komponente des Lignins anspricht (Creighton, Gibbs u. Hibbert 1944). Was nun die am häufigsten verwendete Phloroglucin-HCl-Reaktion betrifft, so ist von jeher ihre verhältnismäßig geringe Spezifität evident gewesen. Letztere Reaktion sollte man nur als Hinweis für das mögliche Vorliegen von Lignin werten, niemals als Nachweis. Eine vielleicht exaktere histologische Nachweis-Methode stellt die durch Caspersson entwickelte UV-Histospektroskopie dar, wie die aufschlußreichen Arbeiten von P. W. Lange (1950) zeigen. Bekanntlich besitzen die aromatischen Kerne des Lignins eine selektive Absorption im UV bei etwa 2800 Å, die mit Hilfe der Caspersson-Apparatur

zur histologischen Darstellung gebracht werden kann. Dieser Weg schien auch für unsere Untersuchungen geboten zu sein. Neben der vergleichenden Anwendung der „klassischen" Verholzungsreaktionen, über die jüngst auch ULLRICH (1955) berichtet hat, analysierten wir unter Verwendung einer CASPERSSON-Apparatur die einzelnen Gewebebezirke der Nadelschnitte auf Gehalt und cytologische Verteilung des Lignins. Dabei stellte sich in Übereinstimmung mit bereits vorliegenden Befunden (LANGE 1950) rasch heraus, daß der prozentuale Lignin-Anteil der Mittellamelle und Cambialwand verholzter Zellen um ein bedeutendes höher ist als derjenige der Sekundär- und Tertiärwand (s. auch BUCHER 1953). Bei manchen Sclerenchymfasern waren die Sekundärschichten überhaupt unverholzt, obgleich die Phloroglucin-HCl-Reaktion totale Lignifizierung der Zellmembran anzeigte! In Abb. 8 ist das UV-Mikro-Spektrophotogramm einer Sclerenchymfasergruppe wiedergegeben, das diese Ausführungen illustriert. Stellt man die Ergebnisse der UV-Analyse und des Phloroglucin-Testes den Befunden über den Einbau der Ligninmonomeren gegenüber (Tabelle 6), so zeigt sich paradoxerweise, daß die radioaktiven Monomeren bevorzugt in solche Zellen eingelagert werden, die frei von Lignin sind oder nur wenig verholzen. Vielleicht könnte es als plausible Deutung gelten, daß die Nadeln ihre Wachstums- und Differenzierungsvorgänge zum Zeitpunkt der Application der Isotopen im wesentlichen abgeschlossen hatten. Da in den verholzten Zellen die biochemische Aktivität des Cytoplasmas verlorengeht, andererseits die Verwertung der markierten Glucoside nur mit Hilfe spezifischer Enzyme

*Tabelle 6*

| | UV-Absorption 2763 Å u. 2836 Å | Phloroglucin-HCl-Reaktion | $\beta$-Strahlung |
|---|---|---|---|
| Epidermis | sehr stark (Cutin!) | stark | sehr schwach |
| Hypodermis | stark (Lignin) | stark | schwach |
| Parenchym Zellwand | schwach bis fehlend | Mittellamelle schwach, Sekundärwand: fehlend | sehr stark |
| Parenchym Lumen | fehlend | fehlend | schwach bis mittelstark |
| Endodermis | stark | stark | stark |
| Transfusions-Parenchym | fehlend | fehlend | stark bis sehr stark |
| Xylem | sehr stark | stark | sehr schwach |
| Phloem | fehlend (Nucleoproteide der Zellkerne: stark) | fehlend | stark bis sehr stark |

möglich ist, wurden die Stoffe in zwar lebenden, jedoch unverholzten Zellen gespalten und eingebaut.

Ob dem Einbau eine Ligninpolymerisation zugrunde liegt oder ein davon absolut verschiedener Prozeß, könnte nur mit chemischen Methoden entschieden werden.

Wenn die oben dargelegte Deutung über die „abnorme" Art des Einbaus richtig ist, müßte das Verteilungsmuster der Radioaktivität beim Einbau in junge wachstumsfähige und noch unverholzte Nadeln vor allem eine Strahlungsakkumulation in den zur Verholzung bestimmten Bezirken (Xylem, Endodermis) zeigen. Weitere Untersuchungen sollen diese Frage klären.

## Statistischer Teil

(Unter Mitarbeit von R. Wette, Heidelberg)

Das durch die quantitative Auswertung der Radioautographien mittels der Zählmethode sich ergebende umfangreiche Zahlenmaterial macht eine Reduktion der Daten erforderlich, die in der Zusammenfassung gleichartiger Daten (z. B. verschiedene Stellen eines Schnittes, verschiedene Schnitte eines Objektträgers, verschiedene Objektträger einer Versuchsserie) besteht. Die Reduktion der hier vorliegenden Zähldaten ist durch Addition vorzunehmen und eigentlich nur dann statistisch zulässig, wenn es sich um homogene Daten handelt. Es muß der Zusammenfassung der Daten und der statistischen Auswertung bezüglich der eigentlichen Fragestellungen eine Homogeneitätsprüfung vorausgehen.

1. Somit wäre als erstes eine statistische Prüfung auf homogene Verteilung innerhalb eines Gewebes ein und desselben Schnittes zu fordern. Die 5 Werte müssen erwartungsgemäß Poisson-verteilt sein (Null-Hypothese). Es ist eine Prüfung durchführbar mit

$$\chi^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{\bar{x}} \text{ bei } FG = k - 1.$$

Es wurden zur Prüfung solche Schnitte herausgesucht, die am meisten heterogen erscheinen:

$\chi^2 = 2{,}2272 \quad FG = 4 \quad P > 0{,}5$
$\chi^2 = 3{,}652 \quad FG = 4 \quad P > 0{,}3$
$\chi^2 = 4{,}244 \quad FG = 4 \quad P > 0{,}3$
$\chi^2 = 3{,}975 \quad FG = 4 \quad P > 0{,}3$
$\chi^2 = 4{,}635 \quad FG = 4 \quad P > 0{,}3$

Folglich handelt es sich um homogene Daten.

2. Es ist die Homogeneität der verschiedenen Schnitte eines Objektträgers mit der $\chi^2$-Methode ($m \times k$-Tafel) zu untersuchen. Der Nulleffekt wird in Abzug gebracht, da dieser die Ergebnisse im Sinne einer Heterogeneitätsverringerung verfälscht. Ergebnisse zweier zufallsmäßig ausgewählter Objektträger:

$\chi^2 = 19{,}525 \quad FG = 14 \quad P > 0{,}1$
$\chi^2 = 19{,}724 \quad FG = 14 \quad P > 0{,}1$

Folglich handelt es sich auch hier um homogene Daten.

3. Nach einer statistischen Sicherung von 1. und 2. soll nun die Homogeneitätsprüfung verschiedener Objektträger, die ein und derselben Versuchsserie angehören, vorgenommen werden, wobei der Nulleffekt wieder zu eliminieren ist ($\chi^2_{\text{hom}}$ berechnet durch $\chi^2$-Zerlegung: Null-Hypothese „Poisson-Verteilung" = Tabelle 7.

*Tabelle 7*

| Versuchsserie | $\chi^2_{hom}$ | $FG$ | $P$ | Versuchsserie | $\chi^2_{hom}$ | $FG$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $U_1$ | 446,657 | 21 | $\ll 0{,}001$ | $U_7$ | 135,025 | 28 | $\ll 0{,}001$ |
| $U_2$ | 37,314 | 21 | $\sim 0{,}015$ | $U_8$ | 116,214 | 21 | $\ll 0{,}001$ |
| $U_4$ | 67,552 | 21 | $\ll 0{,}001$ | $U_9$ | 30,427 | 14 | $< 0{,}01$ |
| $U_5$ | 319,116 | 21 | $\ll 0{,}001$ | $U_{10}$ | 64,107 | 14 | $\ll 0{,}001$ |
| $U_6$ | 212,608 | 21 | $\ll 0{,}001$ | | | | |

Nach den Werten der Tabelle 7 ist die Heterogeneität gesichert, d. h. die Daten sind für weitere Vergleiche nicht zusammenfaßbar.

4. Es ist zu prüfen, ob die Verteilung der Radioaktivität über die verschiedenen Gewebe Unterschiede zeigt *zwischen* den einzelnen applizierten Substanzen (4a); für *eine* Substanz sind Unterschiede zu sichern zwischen:

4b I Tauchtrieb und Nebenzweig
4b II Tauchtrieb und Tauchtrieb
4b III Nebenzweig und Nebenzweig.

Zu berechnen ist dafür: $\chi^2$-Varianzanalyse zur Berücksichtigung der Heterogeneität innerhalb der Serien (Binnen-Serien-$\chi^2 = \chi^2_A$ bzw. $\chi^2_B$ aus der $m_A \, x \, k$- bzw. $m_B \, x \, k$-Tafel der entsprechenden Serien; Zwischen-Serien-$\chi^2_Z$ aus der $2 \, x \, k$-Tafel nach der Brandt-Snedecor-Formel mit den Summen der Serien) mit

$$F = \frac{(n_A + n_B) \cdot \chi^2_Z}{n_Z \cdot (\chi^2_A + \chi^2_B} \quad [1] \qquad \begin{array}{l} \text{bei } FG_1 = n_Z \; [1] \\ \text{bei } FG_2 = n_A + n_B \end{array}$$

Ergebnisse einiger Vergleiche:

Tauchtrieb gegen Nebenzweig

$$F = 1{,}284 \quad \begin{array}{l} FG_1 = 6 \\ FG_2 = 42 \end{array} \qquad P > 0{,}2$$

Tauchtrieb gegen Tauchtrieb

$$F = 1{,}679 \quad \begin{array}{l} FG_1 = 6 \\ FG_2 = 35 \end{array} \qquad P > 0{,}1$$

Nebenzweig gegen Nebenzweig

$$F = 14{,}298 \quad \begin{array}{l} FG_1 = 6 \\ FG_2 = 42 \end{array} \qquad P \ll 0{,}001$$

Folglich ist ein Unterschied nur für 4b III, jedoch nicht für 4b I und II zu sichern.

5. Im Falle der Epidermis, der Subepidermis (des Hypoderms) und des Xylems ist der Organeffekt ($E$) gegen den Untergrundeffekt ($U$) zu sichern. Der Gesamteffekt ($G$) stellt die Summe von Organ- und Untergrundeffekt dar ($G = E + U$). Als Null-Hypothese gilt $E =$ Null. Eine Prüfung hierauf ergibt sich (unter Berücksichtigung der Poisson-Verteilung) mit

$$\chi^2 = \frac{E^2}{G} \text{ bei } FG = 1 .$$

[1] Eine eingehende Begründung des Verfahrens wird R. Wette (Heidelberg) an anderer Stelle veröffentlichen.

Die Prüfung ist mit Hilfe eines Nomogramms

$$E^2 = G \cdot \chi^2 \text{ für } \chi^2 (P/2 = 0{,}01) \text{ und } \chi^2 (P/2 = 0{,}05)$$

am einfachsten durchzuführen (Abb. 9).

Da 93% aller Organwerte im Nomogramm innerhalb des Sicherungsbereiches ($P/2 \leqslant 0{,}01$) liegen, kann ein Organeffekt als durchgehend gesichert angesehen werden.

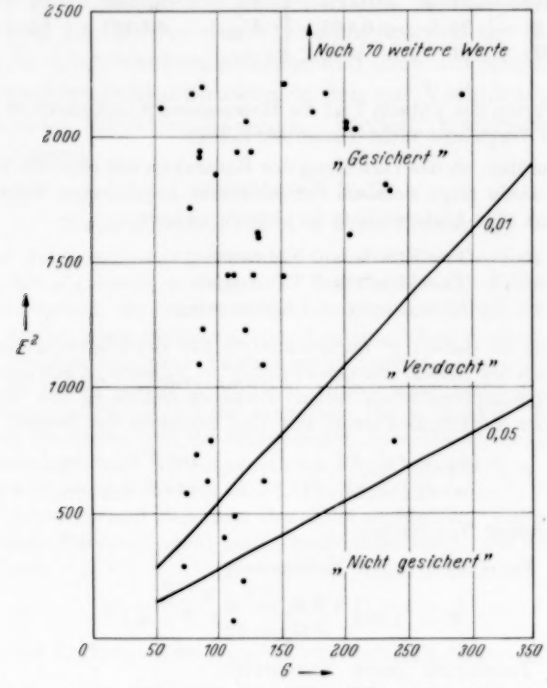


Abb. 9. Nomogramm zur Sicherung des Organeffektes ($E$) einiger schwach aktiver Gewebe

## Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Der Einbau $^{14}C$-markierter Lignin-Vorstufen (D-Coniferin, D-Glucovanillin, D-Glucosyringaaldehyd) in Fichtennadeln wurde auf mikroautoradiographischem Wege untersucht.

Von der in die Nadeln eingebrachten Radioaktivität geht der größere Teil bei der Fixationsprozedur verloren. Die nicht auswaschbare Radioaktivität ist vorwiegend in den Zellwänden lokalisiert.

Als Maß des Einbaus diente die mit Hilfe des Granula-Zählverfahrens ermittelte Granuladichte des „stripping films". Die Granuladichte war im Mesophyll-Parenchym, Transfusions-Parenchym und Phloem hoch, in den lignifizierten Teilen (Xylem, Sclerenchym) niedrig.

Für die hohe Granuladichte der lebenden Zellen des Transfusionsgewebes in Versuchen der Glucosyringaaldehyd-Serie wird eine Deutung

gegeben. Zuweilen auftretende Aktivitätsnester in den Harzgängen und im Hypoderm werden beschrieben.

Zwischen den Ergebnissen der UV-histospektroskopischen Lignin-Nachweismethode und der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion bestehen zuweilen deutliche Diskrepanzen.

Die markierten Glucoside werden bevorzugt in ligninfreien oder nur schwach verholzten Geweben gespeichert. Die Lignin-Natur der eingebauten Verbindungen ist nicht gesichert.

Das ermittelte Zahlenmaterial wurde statistisch geprüft. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Herrn Prof. Freudenberg (Heidelberg) und seinen Mitarbeitern sind wir für die Überlassung der markierten Glucoside, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Instrumenten und Chemikalien zu großem Dank verpflichtet.

## Literatur

Bucher, H.: Die Tertiärlamelle von Holzfasern und ihre Erscheinungsformen bei Coniferen. Unters.-Labor. Cell Fabr. Attisholz A.G. 1953. — Creighton, R. H. J., R. D. Gibbs and H. Hibbert: Studies on lignin and related compounds. LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification. J. Amer. chem. Soc. **66**, 32—37 (1944). — Fisher, R. A., and F. Yates: Statistical Tables. London 1949. — Freudenberg, K.: Lignin. In Paech-Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. III, S. 499—516. 1955. — Freudenberg, K., H. Reznik, W. Fuchs u. M. Reichert: Untersuchung über die Entstehung des Lignins und des Holzes. Naturwiss. **42**, 29—35 (1955). — Gross, J., R. Bogoroch, N. J. Nadler and C. P. Leblond: The theory and methods of the radioautographic localization of radioelements in tissues. Amer. J. Roentgenol. **65**, 420—458 (1951). — Huber, B.: Zur Mikrotopographie der Saftströme im Transfusionsgewebe der Koniferennadel. Planta (Berl.) **35**, 331—351 (1948). — Lange, P. W.: Optical methods for microanalysis of the plant cell wall. Svensk Papperstidn. **53**, 749—766 (1950). — Levi, H.: Quantitative $\beta$-track autoradiography of single cells. Exper. Cell Res. **7**, 44—51 (1954). — Snedecor, G. W.: Statistical Methods. Iowa 1946. — Sperling, F.: Electron-track autoradiography of radioactive frog embryos. Nature (Lond.) **174**, 749 (1954). — Ullrich, J.: Vergleichende Untersuchungen über Verholzung und Verholzungsreaktionen. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 93—104 (1955).

Dr. H. Reznik, Heidelberg, Botan. Instit. d. Univ.

Planta, Bd. 47, S. 16—46 (1956)

Aus dem Institut für Pharmakognosie der Universität Kiel

# UNTERSUCHUNGEN ZUM PROBLEM DER SEROLOGISCHEN FERNREAKTIONEN*

Von

O. Moritz und H. L. Rohn

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 3. Dezember 1955)*

Nachdem die Ergebnisse der von Mez und seinen Schülern, die im Königsberger serologischen Stammbaum des Pflanzenreiches (Mez und Ziegenspeck 1926) ihren Niederschlag fanden, bereits begonnen hatten, die unterrichtsmäßige Darstellung der Pflanzensystematik weitgehend zu beeinflussen (vgl. Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 16. Aufl. 1923), ist inzwischen eine starke Gegenreaktion eingetreten. In der 25. Auflage des Strasburgerschen Lehrbuches (1951) heißt es in der Einleitung zum systematischen Teil: „Man hat sich sogar — freilich bisher ohne viel Erfolg — bemüht, die Verschiedenheiten der pflanzlichen Eiweiße mit Hilfe der Reaktionen eiweißhaltiger Pflanzenauszüge bei serodiagnostischen Untersuchungen zu erfassen und der Systematik dienstbar zu machen." Man kann danach sagen, daß die heute übliche Darstellung der Systematik der Pflanzen aufgehört hat, die Ergebnisse der phytoserologischen Arbeiten zu berücksichtigen. Offenbar hat die abfällige Kritik, welche Gilg und Schürhoff und ihre Schüler sowie Hannig und Slatmann an der Arbeitsweise der Königsberger Serologen und ihren Ergebnissen übten, stärkeren Einfluß ausgeübt als die zustimmenden Äußerungen von Krohn (1933) und Boom (1930). Bezüglich der einzelnen Literaturstellen sei auf die Zusammenfassung von Chester (1937a) sowie die Arbeiten von Moritz (1928, 1932a, 1933, 1934a u. b) verwiesen. Auch die serologischen Arbeiten von Moritz (1942), Moritz u. vom Berg (1931), Moritz u. Rohn (1937) und von vom Berg (1932) aus dem Kieler botanischen Institut haben diese Entwicklung nicht aufgehalten, obwohl sie den grundsätzlichen Nachweis der Brauchbarkeit serologischer Methodik für botanische Verwandtschaftsforschungen erbringen und grundlegende Irrtümer in den Arbeiten aufdecken, die sich gegen eine Verwendbarkeit serologischer Reaktionen für Zwecke der botanischen Systematik aussprachen. Wenn trotzdem

* Ausführliche Versuchsprotokolle der Untersuchungen, über die hier berichtet wird, finden sich in der Dissertation: H. L. Rohn, Zur Frage phytoserologischer Fernreaktionen (Kieler Diss. 1940; ein Exemplar dieser Dissertation liegt im Institut für Pharmakognosie der Universität Kiel und kann hier eingesehen werden).

diese Methode der botanischen Verwandtschaftsforschung mehr und mehr in Vergessenheit zu geraten droht, so dürfte unter anderem der Grund auch darin liegen, daß die erwähnten Kieler Arbeiten fast ausschließlich sich in dem Bereich engster Verwandtschaftskreise bewegen (Bastardserologie u. dgl.). Man wird diese Entwicklung bedauern müssen, zumal inzwischen auf dem Gebiete der zoologischen Systematik vor allem durch die Arbeiten BOYDENS (1942, 1954) und seiner Schule sehr beachtliche Erfolge mit serologischen Reaktionen erzielt werden konnten. Hier sei nur auf den Nachweis von Eiweißgemeinsamkeiten bei den Paarhufern und den Walen durch BOYDEN u. GEMEROY (1950) hingewiesen. Angeregt durch diese Erfolge der Schule BOYDENS haben aber in jüngster Zeit nordamerikanische Botaniker begonnen, die Präcipitationsmethode in der Form, in der sie BOYDEN und seine Schüler entwickelten, auch für die Bearbeitung botanisch-systematischer Fragen zu verwenden (JOHNSON 1954, BAUM 1954, HAMMOND 1955).

Allerdings sind mittels der in den Kieler serologischen Arbeiten verwendeten Anaphylaxiereaktionen in der Form des SCHULTZ-DALEschen Versuchs äußerst selten Reaktionen erzielt worden, die über den Bereich einer Familie hinausgreifen. Berücksichtigt man die wohl allgemein anerkannte Tatsache (vgl. DOERR 1950, 1951), daß die Sensibilisierung eines Meerschweinchens für artfremdes Eiweiß eine Reaktion ist, welche die Empfindlichkeit der üblicherweise verwendeten Präcipitation beachtlich übertrifft, so wird man mit Recht von einem „Reichweiten-Paradoxon" (MORITZ u. ROHN 1937) sprechen können, wenn mit Hilfe dieser Reaktion die Auffindung von Eiweißgemeinsamkeiten zwischen Arten verschiedener Familien anscheinend nur ausnahmsweise gelingt, während im Rahmen der Königsberger serologischen Arbeiten solche Familienverknüpfungen mit der Präcipitationsreaktion mit großer Regelmäßigkeit gelungen sind. Denn einerlei ob die Auffindung geringer Mengen unterscheidender Eiweißkörper beim Vergleich nahe verwandter Formen oder die Auffindung geringer Mengen gemeinsamer Proteine bei systematisch einander entfernt stehenden Formen das Untersuchungsziel ist, wird der gestellte Anspruch an die Methodik der gleiche sein: geringe Mengen bestimmter Proteine neben relativ großen Mengen anderer Proteine zu entdecken.

Im folgenden Bericht werden nun Versuche zur Auflösung dieses Paradoxons dargestellt. Aufgabe dieser Arbeit war es also, entweder zu einer Begründung des Ausbleibens serologischer Fernreaktionen bei Verwendung der Anaphylaxiemethode zu gelangen oder Möglichkeiten zur Erzielung solcher Reaktionen aufzufinden. Erwies sich diese Möglichkeit als gegeben, so waren die erhaltenen Reaktionen solchen von Voruntersuchern, die an vergleichbarem Material aber mit der Präcipitationsmethode erhalten wurden, gegenüberzustellen.

## Methodik

Die verwendete Methodik unterschied sich hinsichtlich der Anstellung der Anaphylaxiereaktion nicht grundsätzlich von der früher von Moritz (1934) beschriebenen. Technische Einzelheiten der Apparatur, die in dieser Arbeit verwendet wurden, können in der eingangs erwähnten Dissertation nachgelesen werden. Ferner sei auf die bei Doerr (1950, 1951) zitierte methodische Literatur verwiesen.

## Material

Als Antigenmaterial dienten ausschließlich Samen der untersuchten Arten. Das Material wurde teils aus dem Samenaustausch der botanischen Gärten, teils aus dem Handel bezogen. Zum Teil stellten auch Kollegen in dankenswerter Weise Samenmaterial in ansehnlichen Mengen zur Verfügung. Soweit nicht die systematische Zugehörigkeit des Materials eindeutig feststand, wurden Proben in Kultur genommen und die erhaltenen Pflanzen bestimmt. Bezüglich der Materialvorbehandlung sei auf die einzelnen Abschnitte verwiesen.

## Systematischer Bereich

Gewählt wurde Material aus dem Verwandtschaftsbereich der *Rhoeadales*, aus dem Voruntersuchungen von Gohlke (1913) und Preuss (1917) aus der Mezschen Schule vorlagen.

## Spezielle Probleme der Arbeit

Bei der Planung der Untersuchungen zur Auflösung des „Reichweiten-Paradoxons" gingen wir von folgenden Voraussetzungen aus:

1. Die beiden Reaktionen der Präcipitation und der Anaphylaxie stellen lediglich verschiedenartige Formen der Sichtbarmachung grundsätzlich gleichartiger Antigen-Antikörperreaktionen dar. Also ist auch nicht zu erwarten, daß die Spezifität beider Reaktionen sich grundsätzlich unterscheidet, wenn es auf die Entdeckung bestimmter Proteingemeinsamkeiten zwischen verwandten Arten ankommt.

2. Unterschiede bestehen lediglich hinsichtlich der gewählten Tierart (Kaninchen für die Präcipitation, Meerschweinchen für die Anaphylaxie), ferner möglicherweise Unterschiede bezüglich der Vorbehandlung des Antigenmaterials bei denjenigen Untersuchern, die Präcipitationsreaktionen verwerteten, und unseren eigenen früheren Untersuchungen, die sich der Anaphylaxie bedienten.

3. Als bekannt konnte ferner vorausgesetzt werden, daß im allgemeinen geringe Mengen bestimmter Eiweißkörper, die neben größeren Mengen anderer Eiweißkörper nachzuweisen sind, um so eher in einer Immunsensibilität zur Abbildung gelangen, je weitergehend die Inkubationszeiten (Fristen zwischen letzter sensibilisierender Antigen-

injektion und Anstellung der Erfolgsreaktion) variiert und je höhere Mengen an Antigenmaterial injiziert werden. Bezüglich einer Darlegung dieser Verhältnisse sei auf Moritz (1932, 1934) verwiesen.

Danach waren, da die Wahl einer anderen Tierart kaum in Frage kam, insbesondere die Antigenvorbehandlung und die Behandlung der Versuchstiere (Injektionsmenge, Häufigkeit der Injektion, Inkubationszeit) zu variieren und der Einfluß dieser Faktoren auf das Auftreten familienverknüpfender Reaktionen zu betrachten.

### Versuche mit Antigenmaterial nach üblicher Vorextraktion und unter Änderung von Inkubationszeit und Injektionsmenge

Unter „üblicher Vorextraktion" wurde erschöpfende Extraktion des fein gemahlenen, über $CaCl_2$ im Vakuum getrockneten Samenmaterials mit absolutem Äther oder Petroläther und danach mit absolutem Aethanol oder Methanol im Soxlethapparat verstanden. Während der Extraktion wird dabei das Material durch Aufsetzen eines Chlorcalciumrohres auf den Kühler vor Wassereinwirkung geschützt. Als Extraktionshülsen dienten Glasrohre, die unten durch eine Lage Zellstoff und übergebundene Mullstreifen verschlossen waren. Denn bei der Verwendung von Filterpapierhülsen wird häufig eine unvollständige Extraktion der inneren Bezirke des Materials beobachtet, da das Extraktionsmittel vorwiegend auf die Randschichten einwirkt.

Früher veröffentlichte Versuche hatten ergeben, daß bei einmaliger Injektion verdünnter Extrakte des Antigenmaterials (Extraktionsmittel stets Tyrodelösung) sich mit Regelmäßigkeit nur Reaktionen mit nah verwandten Formen ergaben. Reaktionen, die man als Fernreaktionen hätte ansprechen können, etwa von *Chelidonium* zu *Cruciferen*, also familienverknüpfende Reaktionen, sind in den früheren Voruntersuchungen allenfalls ausnahmsweise und nach längerer Inkubationszeit erhalten worden (s. Tabelle 10). Dementsprechend wurden nunmehr die Injektionen häufig wiederholt und die Inkubationszeiten wesentlich verlängert.

Zur Erzeugung von Sensibilitäten wurde das Material folgender Arten (die also als „Zentren" zu bezeichnen wären) verwandt: Aus der Familie der Papaveraceen: *Chelidonium majus*, *Papaver somniferum*, *Glaucium flavum*, *Sanguinaria canadensis*; Capparidaceen: *Capparis inermis*, *Cleome spinosa*; Cruciferen: *Sinapis alba*, *Sisymbrium austriacum*; Resedaceen: *Reseda Luteola*, *Reseda alba*; Moringaceen: *Moringa oleifera*; Berberidaceen: *Berberis vulgaris*. Das Antigenmaterial wurde in den aus der Tabelle 1 ersichtlichen Ansatzverhältnissen mit physiologischer Salzlösung verschüttelt, dann zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit zur Injektion benutzt. Zur Herstellung der physiologischen Salzlösung (Tyrodelösung) wurde sterilisiertes destilliertes Wasser verwendet.

Die Injektionen erfolgten wie bei uns üblich intraperitoneal. Die Abstände zwischen den einzelnen Injektionen variierten von 1—2 Tagen je nach der Anzahl beabsichtigter Injektionen. Von den so behandelten Tieren fiel ein Teil aus, da er vor der Möglichkeit der Anstellung von Erfolgsreaktionen starb. Diese Ausfälle können sowohl zurückzuführen sein auf unspezifische Giftstoffe, die in den Antigenmaterialien noch enthalten waren und durch die Extraktionsmittel nicht entfernt wurden, wie auf echte anaphylaktische Reaktionen, die begreiflicherweise bei häufiger Wiederholung der Injektionen auftreten können. Als sensibel werden alle Tiere bezeichnet, die eindeutige Reaktionen mit homologem oder verwandtem Antigenmaterial zeigten, als fernsensibel nur solche Tiere, bei denen sich eindeutige Reaktionen mit Antigenmaterial aus anderen Familien erzielen ließen. Es versteht sich von selbst, daß bei der Anstellung der Reaktionen alle früher geschilderten Möglichkeiten der Reaktionssicherung eingebaut wurden. Nach einer positiven Reaktion wurde also das gleiche Antigen nochmals geboten und damit kontrolliert, ob die Reaktion zu einer Absättigung geführt oder ob ein unspezifischer Reizstoff die Zuckung hervorgerufen habe. Ferner wurde die letzte negative Reaktion stets nochmals kontrolliert, indem ein unspezifisches Reizmittel (Tenosin) zugegeben wurde, worauf eine erneute Zusammenziehung des Muskels erfolgen mußte. (Vgl. diesbezüglich die Darlegungen von Moritz 1934.) Auch wurden gelegentlich, jedoch nicht regelmäßig, Versuche angestellt, ob Reaktionen mit völlig fernstehenden Familien etwa *Pinaceen* oder *Papilionaceen* auftraten. Derartige „asystematische" Reaktionen sind jedoch niemals beobachtet worden.

Außerdem wurden an einer Serie von 9 Normaltieren, die also nicht injiziert worden waren, die sämtlichen in dieser Arbeit als Reaktionsantigene verwendeten Materialien daraufhin geprüft, ob sie mit den Uterushörnern nicht vorbehandelter Tiere eine Reaktion ergaben. Verwendet wurden ausschließlich solche Antigene, bei denen eine solche Normaltierreaktion nicht erhalten werden konnte.

In der nunmehr folgenden Tabelle 1 sind die Versuche, welche an Tieren angestellt wurden, die mit Material injiziert worden waren, das mit Äther und Alkohol vorextrahiert war, summarisch zusammengefaßt.

Bei den beiden mit *Moringa oleifera* injizierten Tiergruppen wurde bei der Zubereitung der Injektionsantigene in etwas abweichender Weise verfahren. Bei der Bereitung der Injektionslösungen für die Tiergruppe I wurde das Antigenmaterial in der üblichen Ansatzkonzentration mehrfach mit physiologischer Salzlösung ausgeschüttelt, die Extrakte wie üblich zentrifugiert und filtriert und dann im Vakuum bei 35° C auf das Volumen einer Ausschüttelung eingeengt. Bei der Tiergruppe II wurde das extrahierte Samenmaterial in der Ansatzstärke 1:50 mit der physiologischen Salzlösung wieder aufgeschüttelt und die Suspension injiziert.

*Tabelle 1*

| Injektionsantigene | Injizierte Antigenmenge | Zahl der Tiere insgesamt | Ausfälle | Davon sensibel | Fern-sensibel |
|---|---|---|---|---|---|
| Chelidonium majus . . . | 12 × 2 ml 1:50 | 10 | 1 | 8 | 3 |
| Chelidonium majus . . . | 9 × 2 ml 1:50 | 10 | 3 | 6 | 3 |
| Chelidonium majus . . . | 7 × 2 ml 1:50 | 7 | 3 | 2 | 1 |
| Papaver somniferum . . | 9 × 2 ml 1:50 | 7 | 2 | 3 | 1 |
| Papaver somniferum . . | 4 × 2 ml 1:50 | 10 | 7 | 2 | 0 |
| Glaucium flavum . . . . | 6 × 2 ml 1:50 | 10 | 4 | 4 | 0 |
| Sanguinaria canadensis . | 3 × 2 ml 1:50 | 10 | 5 | 2 | 0 |
| Capparis inermis . . . . | 11 × 2 ml 1:50 | 10 | 2 | 6 | 0 |
| Cleome spinosa . . . . . | 6 × 2 ml 1:50 | 7 | 1 | 6 | 1 |
| Sinapis alba . . . . . | 10 × 2 ml 1:50 | 10 | 1 | 7 | 5 |
| Sisymbrium austriacum . | 7 × 2 ml 1:50 | 7 | 6 | 2 | 1 |
| Sisymbrium austriacum . | 4 × 2 ml 1:50 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| Moringa oleifera I . . . . | (s. Text) | 5 | 1 | 2 | 0 |
| Moringa oleifera II . . . | (s. Text) | 5 | 0 | 3 | 1 |
| Reseda Luteola . . . . . | 8 × 2 ml 2:50 | 12 | 10 | 2 | 1 |
| Reseda alba . . . . . | 9 × 2 ml 1:50 | 8 | 2 | 5 | 3 |
| Berberis vulgaris . . . . | 6 × 2 ml 1:50 | 7 | 1 | 6 | 1 |

Bei beiden Tiergruppen erfolgte nur eine Injektion. Wie ersichtlich, erbrachte die Injektion mit dem konzentrierten Antigenmaterial keinerlei Vorteile. Ferner zeigte sich, daß durch diese Behandlung das Samenmaterial noch nicht erschöpft war, so daß die Injektion mit der Suspension noch durchaus brauchbare Sensibilitäten ergab.

Die Angaben der Tabelle 1 sagen noch nichts aus über die systematische Auswertbarkeit der erhaltenen Reaktionen. Die Diskussion hierüber sei auf später verschoben. Überblickt man aber die summarischen Aussagen dieser Übersicht, so fällt auf, daß die Zahl der Ausfälle hoch ist [51 von 139 insgesamt eingesetzten Tieren (= 36,8%)], aber von Antigenmaterial zu Antigenmaterial schwankt. Auf die möglichen Ursachen dieser Ausfälle wurde bereits oben hingewiesen. Verglichen mit den hier nicht berücksichtigten Vorversuchen, bei denen nur eine oder wenige Injektionen verabfolgt wurden, traten Reaktionen gegen Arten anderer Familien häufiger auf, relativ häufig bei *Chelidonium*- und *Sinapis*-Sensibilitäten. Aber die Gesamtausbeute an fernsensiblen Tieren muß noch als unbefriedigend bezeichnet werden [23 von 139 eingesetzten und von 67 überhaupt sensiblen Tieren (= 16,5% bzw. 34,4%)].

Was die in der Tabelle nicht berücksichtigten Inkubationszeiten angeht, so gilt, daß im allgemeinen die Sensibilität gegen das homologe Antigen nach einer Inkubationszeit von 21—30 Tagen ohne weiteres darstellbar war. Das Auftreten von Sensibilitäten gegen Arten der gleichen Familie, insbesondere von als nahe verwandt anzusehenden Arten, ist ebenfalls im allgemeinen bereits innerhalb dieses Zeitraumes zu beobachten. Reaktionen mit Reaktionsantigenen, die anderen Familien angehörten als das zur Sensibilisierung verwendete Antigen,

konnten ausnahmslos nur nach längeren Inkubationszeiten beobachtet werden. Verfolgen wir den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des Sensibilitätsbildes bei der Gruppe derjenigen Tiere, die mit *Chelidonium majus*-Material injiziert worden waren, so zeigte von 4 Tieren, die während der Inkubationsperiode von 30—47 Tagen untersucht wurden, nur eines am 31. Tag eine schwache, kaum positiv zu wertende Reaktion mit *Brassica Rapa*. Erst ein Tier, das nach 58tägiger Inkubation untersucht wurde, gab eine deutliche Reaktion mit *Sinapis alba*, nach der Absättigung dieser Teilsensibilität noch eine Reaktion mit *Papaver somniferum* und reagierte danach noch mit dem homologen Antigen *Chelidonium majus*. Alle übrigen interfamiliären Reaktionen (mit Cruciferen, Capparidaceen) und in einem Falle mit *Hydrastis canadensis* (Ranunculaceen) wurden nach Inkubationszeiten erhalten, die zwischen 50 und 93 Tagen lagen. Durchaus Entsprechendes gilt von den Versuchstieren, die mit Capparidaceen- und Cruciferenmaterial injiziert wurden. Auch hier lagen die verwertbaren Fernreaktionen fast ausnahmslos bei Inkubationen, die länger als 50 Tage dauerten. Bei den übrigen Zentren dieser Gruppe wurden daher überhaupt nur Tiere nach entsprechend langer Inkubationszeit in Untersuchung genommen. Wenn trotzdem die Ausbeute an Fernreaktionen so gering ist, muß daran gedacht werden, daß die Beschaffenheit des zur Injektion verwendeten Materials möglicherweise nicht geeignet ist zur Erzeugung von Sensibilitäten, welche Fernreaktionen zulassen.

### Variation der Vorextraktionsmethoden

Da nichts darüber bekannt ist, daß die Behandlung von Proteinen mit Äther oder gar mit Petroläther irgendwelchen nachteiligen Einfluß auf die serologischen Eigenschaften der Proteine hätte, lag es nahe, etwaige Störungen in der Abbildung jener Proteinanteile, welche als familienverknüpfende Merkmale anzusehen sind, bei den Einflüssen der Alkoholvorbehandlung des Materials zu sehen. Störungen durch Äther oder Petroläther wären an sich wohl nur denkbar, wenn Lösungen von Proteinmaterial durch Ausschütteln mit diesen Lösungsmitteln behandelt würden (Schüttelinaktivierung oder -denaturierung von Proteinen). Es war vor allen Dingen an folgende Möglichkeiten der Beeinflussung der Antigenmaterialien durch die Aethanol- oder Methanolbehandlung zu denken:

1. Die Behandlung könnte einen Einfluß auf die Verträglichkeit der Antigene für die Versuchstiere haben. Entweder könnten schädigende Stoffe entfernt werden oder unter dem Einfluß der Vorbehandlung solche schädigenden Stoffe neu entstehen.

2. Die Vorbehandlung mit Aethanol oder Methanol könnte aber auch die eigentlichen serologischen Eigenschaften der Antigene beeinflussen:

a) Es könnten antigenwirksame Stoffe aus dem Material herausgelöst werden, so daß sie also in dem zur Injektion verwendeten Material nicht mehr vorhanden sind, also auch nicht in der Sensibilität abgebildet werden könnten. Betrifft diese Entfernung von Antigenen nur Lipoide, so entspricht sie durchaus dem Zwecke der Vorbehandlung, da ja das Material möglichst frei sein soll von antigenwirksamen Substanzen nichtproteinischer Natur. Handelt es sich aber um Eiweißantigene, so wäre ein solcher Vorgang höchst unerwünscht.

b) Es könnten ohne Herauslösung von Eiweißantigenen durch Denaturierung die Antigeneigenschaften von Proteinen verändert werden. Diese Veränderungen können grundsätzlich entweder in der völligen serologischen Inaktivierung von Proteinen oder in der Hervorrufung neuer Spezifitäten bestehen. Im ersten Fall würde das Material in unerwünschter Weise an Merkmalen verarmen. Im zweiten Fall würde das Material Eiweißmerkmale enthalten, die ihm nicht von Natur aus zukommen und deren Untersuchung vom Standpunkt der Verwandtschaftsforschung betrachtet uninteressant wäre.

Diesen Fragen sind wir in mehreren Versuchsreihen nachgegangen, deren Versuchsanstellung und Ergebnisse im folgenden nur verhältnismäßig kurz referiert werden sollen, obwohl die Versuche ziemlich umfangreich waren.

Die einfachste Methode zur Prüfung dieser Fragen ist die Fortlassung der Alkoholextraktion, wobei also ausschließlich mit ätherextrahiertem Material gearbeitet wurde. Was zunächst die Verträglichkeit derartigen Materials anbelangt, die sich in der Zahl der Ausfälle an Tieren während der Behandlung und der Inkubationszeit ausdrücken würde, so war wohl zu erwarten, daß sie bei verschiedenen Materialien durch den Übergang von der Extraktion mit Äther oder Petroläther und Alkohol zur reinen Ätherextraktion verschieden beeinflußt werden würde. Tatsächlich hielt sie sich bei *Papaver somniferum*-Material bei beiden Behandlungsarten auf ungefähr gleicher Höhe, während bei Material von *Moringa oleifera* und *Sinapis alba* die Sterblichkeit der Tiere nach Behandlung mit Material, das lediglich mit Äther extrahiert war, wesentlich höher lag als bei den Tieren, die mit alkoholextrahiertem Material injiziert worden waren. Aber die Zahl der Ausfälle kann selbstverständlich außerdem durch andere vielfältige Faktoren beeinflußt werden. Durchweg wird man allerdings erwarten können, daß ein zusätzlich mit Aethanol oder Methanol extrahiertes Material bei der Injektion besser vertragen wird als das lediglich mit Äther extrahierte Antigenmaterial. Das geht vor allem daraus hervor, daß die bei unseren Untersuchungen ebenso hohen oder höheren Verluste an Versuchstieren bei Injektion von ätherextrahiertem Material bereits nach einer geringeren Anzahl von Injektionen eintraten. Wir haben also die sensibilisierende Vorbehandlung der Tiere

früher abbrechen müssen als bei der Verwendung von mit Äther und Alkohol vorextrahiertem Samenmaterial.

Das hat andererseits zur Folge, daß die Vergleichbarkeit dieser verschiedenen Versuchsreihen hinsichtlich der Ausbeute an sensiblen oder fernsensiblen Tieren nicht mehr voll gegeben ist. Immerhin geht aus unseren Protokollen hervor, daß diese Ausbeute zweifellos nicht in bemerkenswertem Maße emporschnellte, nachdem wir die Alkoholextraktion wegließen.

Um nun der Frage des Einflusses der zusätzlichen Alkoholextraktion auf die sensibilisierende Wirkung unserer Antigene auf anderem Wege zu prüfen, haben wir Methoden angewandt, die bereits früher Moritz (1932) an Ovalbumin und *Vicia Faba*-Antigenen zur Anwendung brachte. Wir haben also von *Papaver somniferum*-Samen einen Teil des Materials zunächst mit Äther extrahiert und dann einer stundenlangen Digestion mit absolutem Alkohol unter Wasserausschluß bei der Temperatur des Alkohols im Extraktionsraum eines Soxhletapparates ausgesetzt, ohne dabei jedoch zu extrahieren. Wir haben einen Extraktionseffekt weiter dadurch vermieden, daß wir dann den Gesamtansatz zur Trockne brachten, den Alkohol also verdunsten ließen und das Material dann weiter in üblicher Weise im Vakuum trockneten. Ein derartiges Material verhielt sich hinsichtlich der Verträglichkeit etwa wie ein lediglich mit Äther extrahiertes Material, so daß also auch hier bereits nach wenigen Injektionen ein verhältnismäßig hoher Ausfall an Tieren auftrat. Auch bei diesem Material ist also die Ausbeute an sensiblen oder fernsensiblen Tieren, die sich etwa auf der gleichen Höhe hielt wie bei dem nur mit Äther extrahierten Material, nicht mit derjenigen zu vergleichen, die bei mit Äther und Alkohol extrahiertem Material erzielt wurde. Vor allen Dingen wurde aber an solchem Material versucht, festzustellen, ob die denaturierende Behandlung mit Alkohol neue Spezifitäten entstehen ließe. Das geschah in der Weise, daß Tiere mit derartigem Material injiziert wurden und die glatte Muskulatur der Uterushörner zunächst mit systematisch homologem Material, das jedoch nur mit Äther extrahiert war, zur Reaktion gebracht wurde. Würde dann nach dieser Reaktion eine nochmalige Reaktion erfolgen, wenn das auch hinsichtlich der Extraktion homologe Material dem Bade zugegeben wurde, dann war mit der Entstehung neuer Spezifitäten infolge der Denaturierung zu rechnen. Diese Versuche fielen ausnahmslos negativ aus, was in guter Übereinstimmung mit den früheren Angaben von Moritz (1932) steht.

Endlich wurde das alkoholische Extrakt, welches bei der Extraktion von mit Äther vorbehandeltem Material mit Aethanol erzielt wurde, zur Trockne gebracht, in Tyrodelösung suspendiert und Tieren injiziert. Derartiges Material erwies sich als antigen (bei dreimaliger Injektion

einer Suspension von 0,3 g des zur Trockne gebrachten Extrakts in 20 ml Tyrodelösung). Bei 12 Ansätzen starben während der Behandlung zwei Tiere und es erwiesen sich 9 als sensibel. Von diesen 9 sensiblen Tieren haben 3 sogar Fernreaktionen gegeben. Und zwar haben wir bei Inkubationszeiten von über 75 Tagen an zwei Tieren Reaktionen mit *Moringa oleifera*-Antigen erhalten, und an einem dieser Tiere sogar noch eine Reaktion mit *Sinapis alba*, ferner an einem weiteren Tier noch eine Reaktion mit *Sinapis alba* erhalten. Der Befund, daß in das Alkoholextrakt antigenwirksames Material übergeht, steht ebenfalls in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen von Moritz (1932). Hinsichtlich des Problems, ob dieses im Alkoholextrakt enthaltene Material proteinischer oder lipoider Natur ist, neigen wir aus folgenden Gründen zu der zweiten Annahme. Einmal spricht gegen die lipoide Natur des Materials, daß Tiere, die gegen das Alkoholextrakt sensibel wurden, eine klare und eindeutige Reaktion mit dem restlos mit Äther und Alkohol extrahierten Samenmaterial gaben. Es ist wohl höchst unwahrscheinlich, daß derartiges Material noch ausreichende Mengen von Lipoidantigenen enthalten sollte, um mit dem sensiblen System so zu reagieren, daß dieses völlig abgesättigt wird. Zweitens hat sich die Zahl der Untersuchungen, welche gegen die Antigennatur der Lipoide bei der Erzeugung anaphylaktischer Sensibilitäten wenden, noch vermehrt. Freilich ist bekannt (Landsteiner u. di Somma 1940; Gell, Harrington u. Rivers 1946), daß auch nichtproteinische Körper bei der Koppelung mit Proteinen auch im anaphylaktischen Versuch als Antigene oder Haptene wirken können. Aber sowohl die Arbeiten von Lebedewja und Lewinson (1930), Gonzalez, Armangué u. Morato (1932), Gonzalez, Armangué u. Sara Romero (1933), Went u. Lissak (1934), Otto u. Hoffmann (1931), Dessy (1928), Boattini (1929) und von E. Berger (persönliche Mitteilung an Rohn) sprechen gegen die Beteiligung einfacher allverbreiteter Lipoide bei der Erzeugung anaphylaktischer Sensibilitäten. Damit dürften die früher von Klopstock u. Selter (1928) in diesem Sinne gemachten Angaben als widerlegt angesehen werden können. Somit ist wohl damit zu rechnen, daß antigenische Aktivität der Alkoholextrakte zurückzuführen ist auf Mitreißen von Proteinmaterial, wobei alkohollösliche Stoffe als Lösungsvermittler mitwirken mögen. Zusammengefaßt ist zu diesem Problem zu sagen, daß wir bei der zusätzlichen Extraktion von Antigenmaterial mit Alkohol mit der Verarmung des Materials an serologisch aktiven Substanzen, höchstwahrscheinlich Eiweißkörpern, zu rechnen haben, wobei grundsätzlich mit der Möglichkeit zu rechnen ist, daß diese Verarmung spezielle Proteinmerkmale betrifft und quantitativ so weit gehen kann, daß qualitative Unterschiede zwischen nur mit Äther extrahiertem Material und zusätzlich mit Alkohol extrahiertem Material auftreten könnten.

Allerdings haben wir in den Reaktionen unseres Materials derartige Unterschiede nicht bemerkt.

Bestehen bleibt als Ergebnis dieser Versuche lediglich, daß die Variation der Extraktionsmethode praktisch von geringem Erfolg für die Verbesserung der Ausbeute an fernsensiblen Tieren war. Als wichtig hat sich nur die Verlängerung oder jedenfalls die Variation der Inkubationszeit unter Einsatz eines umfangreicheren Tiermaterials und die Erhöhung der Zahl sensibilisierender Injektionen erwiesen. Unter diesen Umständen schien es geraten, einen anderen Weg zur Erreichung des angestrebten Zieles zu verfolgen.

## Versuche mit Albuminfraktionen

Die Erwägungen, die uns zu Versuchen mit der Verwendung von Eiweißfraktionen zur Sensibilisierung unserer Versuchstiere führten, gehen einerseits aus von der Vorstellung, daß der Eiweißbestand eines Organismus eine Pluralität von Antigenen darstellt, andererseits von der Erscheinung der sog. Konkurrenz der Antigene.

Die Vorstellung, daß der gesamte Proteinbestand eines Organismus ein Gemisch vieler verschiedener individueller Proteinarten ist, ist wohlbegründet. Darüber wäre in den zusammenfassenden Werken über Serologie und Immunchemie nachzulesen (Doerr 1947—1952, Schmidt (1950—1955). Diese verschiedenen Proteinarten sind auch serologisch klar voneinander unterscheidbar. So hat das Serumglobulin einer Tierart keinerlei serologische Gemeinsamkeit mit der Albuminfraktion aus dem Serum der gleichen Tierart. Entsprechend können die Proteine des Eiklars der Vogeleier in einzelne Fraktionen aufgeteilt werden, die serologisch wohl unterscheidbare Antigene darstellen. Auch für das Pflanzenreich ist nachgewiesen worden, daß der gesamte Antigenbestand eines pflanzlichen Individuums als ein Mosaik verschiedener Teilantigene (Partigene) anzusehen ist (Moritz 1929, 1932, 1934). Es ist weiter nachgewiesen worden, daß dieser Antigenbestand sich auf die verschiedenen Organe eines pflanzlichen Organismus verschieden verteilt. Man spricht von einem organspezifischen Aufbau des „*Protenoms*" (vom Berg 1932, Moritz 1932). Für die Verwendung dieser Vorstellung im Bereich der Verwandtschaftsforschung, wo also die Proteinbestände der Organismen zu vergleichende Merkmalsbestände sind, ist der Begriff des Protenoms als der Gesamtheit der serologisch erfaßbaren Eiweißmerkmale geschaffen worden. Das einzelne beim serologischen Vergleich als unterscheidend oder zwei Arten verbindend auftretende Eiweißmerkmal ist als *Proten* bezeichnet worden (Moritz 1931). Serologische Analyse eines Organismus oder einer Art bedeutet also vergleichende Beschreibung des Eiweißbestandes dieser Art im Vergleich mit dem Eiweißbestand anderer Arten. Voraussetzung für das Gelingen eines solchen Ver-

gleiches ist das Vorhandensein gemeinsamer oder unterscheidender serologisch faßbarer Eiweißmerkmale (Protene). Werden einander *verwandtschaftlich sehr nahestehende* Formen miteinander verglichen, so ist zu erwarten, daß die Menge der *unterscheidenden* Merkmale gering wird im Vergleich zu den gemeinsamen Merkmalen. Umgekehrt wird beim Vergleich nur *entfernt miteinander verwandter* Formen, z. B. von Arten verschiedener Familien, die Menge derjenigen Proteine, die als *gemeinsame serologische Merkmale* möglicherweise erfaßt werden können, zurücktreten gegenüber der Quantität aller derjenigen Proteinmerkmale, welche die beiden Formen voneinander unterscheiden.

Der Lösung der Aufgabe, solche in geringen Mengen vorhandenen gemeinsamen oder unterscheidenden Eiweißmerkmale neben verhältnismäßig großen Mengen anderer Merkmale nachzuweisen, steht nun eine methodische Schwierigkeit gegenüber. Voraussetzung für die Entdeckung der geringen Mengen ist ja ihre Abbildung durch Partialantikörper des Immunsystems, das als Reagens auf diese Stoffe dienen soll. Es ist einleuchtend, daß die Wahrscheinlichkeit, daß ein in geringer Menge vorhandener interessierender Bestandteil des gesamten Proteinbestandes neben quantitativ überwiegenden Mengen an anderen weniger interessanten Proteinen im Immunsystem zur Abbildung gelangt, verhältnismäßig gering ist und von den Mengenverhältnissen abhängen wird. Freilich kann nicht die Rede davon sein, daß das Immunsystem jemals ein quantitativ getreues Abbild des injizierten Antigensystems ist. Aber durchschnittlich wird man die Möglichkeit, daß ein bestimmter Anteil des injizierten Proteinbestandes im Immunsystem zur Abbildung gelangt, unter dem Gesichtswinkel rein quantitativer Wahrscheinlichkeit betrachten können. Außerdem aber spielen sicher spezifische Eigenschaften der einzelnen Partialantigene eine Rolle. Man kann von qualitativ verschiedener serologischer (sensibilisierender) Aktivität des einzelnen Partialantigens reden. Man spricht von einer Konkurrenz der Antigene und versteht darunter die Tatsache, daß ein quantitativ überwiegendes oder qualitativ besonders aktives Partialantigen in der Lage ist, die Ausbildung von Antikörpern gegen ein anderes Partialantigen zu unterdrücken. Anders ausgedrückt: die Wahrscheinlichkeit, daß ein bestimmtes Partialantigen im System der entstehenden Antikörper abgebildet wird, hängt davon ab, welche Partialantigene außerdem im gesamten injizierten Antigenmaterial vorhanden waren und in welchen Mengenverhältnissen sie zueinander stehen. Daraus folgt zunächst, daß bei Einsatz einer größeren Anzahl von Tieren, welche alle mit dem gleichen Antigenmaterial injiziert wurden, nur eine verhältnismäßig kleine Anzahl der injizierten Tiere eine Sensibilität gegen das in der Konkurrenz unterliegende Partigen zu zeigen braucht. Ferner scheint es so, als ob diese Erscheinung der Konkurrenz der Antigene sich auch so

ausdrücken kann, daß die dosis sensibilisans minima für ein bestimmtes Antigen um so höher wird, je geringer sein Anteil an dem Partigengemisch ist, welches injiziert wird. Daraus folgt (s. oben), daß es unter Umständen notwendig sein kann, die Zahl der Injektionen und die Menge des injizierten Materials zu vermehren, wenn geringe Beimengungen des gesamten Antigenmaterials nachgewiesen werden sollen, einerlei, ob es sich im Sinne der Ziele der großen Systematik um geringe Mengen gemeinsamer Eiweißmerkmale oder im Sinne einer Analyse nahe verwandter Formen um geringe Mengen unterscheidender Eiweißmerkmale handelt. Ein weiterer Weg für die Überwindung der Schwierigkeiten, welche sich der Erreichung derartiger serologischer Ziele entgegenstellen, kann nun auch über die Aufteilung des gesamten Eiweißbestandes eines Organs oder eines Organismus in Fraktionen führen. Für ausführliche Begründungen dieses Weges zu derartiger Überwindung der Konkurrenzerscheinungen sei auf Moritz (1932) verwiesen. Unabhängig von dieser Bedeutung der Aufteilung des zu untersuchenden Eiweißbestandes in Fraktionen ist mit Fraktionierung von pflanzlichen Eiweißkörpern für serologische Zwecke schon mehrfach gearbeitet worden. Verwiesen sei auf die Arbeiten von Zade (1912) und von Arzt (1926). Besonders interessant sind in diesem Zusammenhange Untersuchungen, die Chester (1937 b) an *Solanaceen* durchführte. Chester fällte aus Totalproteinextrakten von Sproßmaterial von Solanaceen das Gesamtprotein durch vollständige Sättigung mit Ammonsulfat. Der erhaltene Niederschlag wurde zur Befreiung von Ammonsulfat gegen physiologische Natriumchloridlösung dialysiert und die erhaltene Lösung sowohl als sensibilisierendes Antigen wie als Reaktionsantigen verwendet. Bei Verwendung derartigen Materials konnten Differenzierungen von Gattungen und Arten der Solanaceen nicht erreicht werden. Als Reaktionsmethode wurde wie in unseren früheren Arbeiten der Anaphylaxieversuch in der Form nach Schultz (1910, 1911) und Dale (1913) verwendet. Wurde nun durch fraktionierte Fällung mit steigender Ammonsulfatkonzentration das Gesamtprotein in die Globulin- und die Albuminfraktion aufgeteilt, so zeigte sich, daß bei Injektion der Albuminfraktion die erhaltenen Immunsysteme von den Totalproteinlösungen jeder anderen Solanacee völlig abgesättigt wurden. Es fand also keine Reaktion mit dem zur Impfung verwendeten Material mehr statt, wenn eine Reaktion mit Totalprotein einer beliebigen anderen Solanacee stattgefunden hatte. Anders verhielten sich jedoch die durch Injektion von Globulinfraktion erhaltenen Immunsysteme. Wird ein derartiges Immunsystem mit der Globulinfraktion einer anderen Art aus der Familie der Solanaceen zur Reaktion gebracht, so führt diese Reaktion nur eine partielle Absättigung herbei und die homologe Globulinfraktion vermag danach noch eine Reaktion hervorzurufen. Die für die Art oder Gattung

spezifischen Eiweißmerkmale dürften daher in der Globulinfraktion zu suchen sein. Bemerkenswert ist noch, daß die Globulin- und die Albuminfraktion derselben species sich voneinander serologisch völlig unterschieden. Das heißt: bei Injektion der Albuminfraktion ergab das sensible System keine Reaktion mit der zugehörigen Globulinfraktion, während die homologe oder die Albuminfraktion aus einer anderen species der Familie der *Solanaceae* sofort eine positive Reaktion ergab. Das entspricht den oben schon mitgeteilten Tatsachen der serologischen völligen Unterschiedenheit verschiedener Eiweißfraktionen aus dem gleichen Organismus. Für CHESTER war die Tatsache, daß die Globulinfraktion die Differenzierung verschiedener species gestattete, von besonderer Bedeutung. Uns erschien im Hinblick auf das Ziel unserer Arbeit die Tatsache besonders wichtig, daß die Albuminfraktion das Bindeglied zwischen den verschiedenen Gattungen einer Familie darstellte. Es ist im übrigen verständlich, daß CHESTER in Anbetracht seiner Untersuchungsziele sich nicht weiter bemüht hat um die Frage, welche Maßnahmen zu treffen wären, um auch von Albuminzentren her Differenzierungen der verschiedenen Arten und Gattungen durchzuführen.

Da es uns vor allen Dingen darauf ankam, im Sinne der oben durchgeführten Überlegungen eine Aufteilung des Proteinbestandes unserer Objekte in Fraktionen vorzunehmen, und da die Albumine der grünen Pflanzenteile nach CHESTER offenbar systematisch weiterreichende Reaktionen zu geben versprachen, haben wir uns damit begnügt, aus unserem Sameneiweißmaterial Albuminfraktionen herzustellen und zur Untersuchung zu bringen. Wir haben uns dabei sehr einfacher Methodik bedient, von der wir hofften, daß sie uns unverändertes Albuminmaterial ergeben würde. Wir haben also vom Einsatz fraktionierter Fällungen oder, was die ideale Methode für die Herstellung vieler möglichst reiner Fraktionen gewesen wäre, von der Verwendung der kataphoretischen Methode abgesehen. Wir gingen so vor, daß wir das mit Äther vorextrahierte Samenmaterial mit physiologischer Kochsalzlösung extrahierten und derartige Extrakte einer Dialyse gegen destilliertes Wasser unterwarfen. Dabei mußten, entsprechend den Löslichkeitsverhältnissen von Albuminen und Globulinen, die Globuline infolge ihrer Unlöslichkeit in destilliertem Wasser weitgehend ausgeschaltet werden können, während die Albumine in der dialysierten Lösung verbleiben mußten. Dialysiert wurde durch Cellophanschläuche, die an ihrem unteren Ende durch Verknotung abgeschlossen wurden. Zur Vergrößerung der relativen Oberfläche wurden entsprechend lange Schläuche gewählt und in diese Schläuche unten geschlossene Glasrohre eingehängt, wodurch sich eine erhebliche Beschleunigung der Dialyse ergab. Das Material wurde zur Verhinderung bakterieller Zersetzung mit Toluol verschüttelt und Toluol auch auf die Oberfläche des im Dialysierschlauch befindlichen Materials

gegeben. Dialysiert wurde bei Zimmertemperatur gegen destilliertes Wasser bis zur Chlorfreiheit des Inhaltes im Dialysierschlauch. Der Inhalt des Dialysierschlauches wurde dann durch Zentrifugieren und Filtrieren von der Globulinfraktion getrennt und zur Injektion verwendet.

Daß wir die Albuminfraktion für unsere Untersuchungen wählten, war nicht nur eine Folge der Untersuchungen von Chester, sondern auch eine Folge der Erwägung, daß der Albumingehalt pflanzlicher Samen im Verhältnis zum Totalproteingehalt durchweg recht gering ist. Wenn also quantitative Konkurrenzerscheinungen eine Rolle spielen würden, so war zu erwarten, daß das Albumin in der quantitativen Konkurrenz den wesentlich reichlicher vorhandenen Globulinen unterliegen könnte. Weiter wurde dabei berücksichtigt, daß bei der Sensibilisierung von Meerschweinchen mit Gemischen aus tierischen Proteinen schon von Dale u. Hartley (1916) und später von Doerr u. Berger (1922) (vgl. hierzu noch Moritz 1929, S. 785) beobachtet worden war, daß die Sensibilität gegen Albumine sich wesentlich später entwickelte als die gegen Globuline, und daß es zu der Erreichung der Sensibilisierung gegen die Albumine wesentlich höherer Injektionsdosen bedurfte. Da nun bei den vorher geschilderten Versuchen sich die Fernsensibilitäten im allgemeinen erst bei längerer Inkubationszeit nachweisen ließen, schien es auch aus diesem Grunde aussichtsreich, die Albuminfraktion zu verwenden.

In Anbetracht des durchweg geringfügigen Anteils der Albumine am Gesamtprotein unseres Materials haben wir einerseits die Ansatzverhältnisse bei Gewinnung der zu dialysierenden Lösungen und Suspensionen so konzentriert gestaltet, wie das technisch möglich war, und andererseits die Zahl der Injektionen und Injektionsdosen so hoch gehalten, wie das nur irgend den Tieren zumutbar war. Trotzdem erwies sich die Verträglichkeit der Dialysate im allgemeinen als recht gut. Im Gesamtdurchschnitt waren bei den Tieren, die mit Dialysaten injiziert wurden, nur etwa 20% an Ausfällen zu verzeichnen gegenüber etwa 36—37% an Ausfällen, die wir bei der Verwendung von Extrakten aus Material zu verzeichnen hatten, das mit Äther und Alkohol vorextrahiert war. Als Reaktionsantigene haben wir für diese Versuche fast ausschließlich Suspensionen von Material verwendet, das lediglich mit Äther extrahiert war. Auf die Geringfügigkeit des Anteils an Albuminen haben wir dadurch Rücksicht genommen, daß wir die Ansatzkonzentrationen erhöhten. Das war möglich, da die Reaktionsanstellung ja eine Selbstkontrolle enthält infolge der Wiederholung der Berührung der Uterusmuskulatur mit jedem Antigen, nachdem eine positive Reaktion mit dem Antigen verzeichnet war. Beruhte die Reaktion auf einer nicht abzusättigenden unspezifischen Empfindlichkeit, so mußte eine Wiederholung der Kontraktion wahrgenommen werden. Wir haben jedoch nur in äußerst

seltenen Fällen aus derartigem Grunde eine Reaktion aus der Wertung auszuschalten gehabt.

Tabelle 2 und 2a vermitteln ein summarisches Bild der Versuche dieser Gruppe.

*Tabelle 2*

| Nr. | Injektionsantigen | Dialyseansatz | | Versuchstiere | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Gesamtzahl | Ausfälle | sensibel | fernsensibel |
| 1 | Papaver somniferum . | 5/25 | 1 × 2,5 ml | 10 | 0 | 10 | 2 |
| 2 | Papaver somniferum . | 6/30 | 4 × 4,0 ml | 10 | 5 | 2 | 1 |
| 3 | Papaver somniferum . | 4,2/32 | 5 × 3,2 ml | 9 | 5 | 3 | 3 |
| 4 | Papaver somniferum . | 6,0/35 | 10 × 2,8 ml | 3 | 0 | 3 | 3 |
| 5 | Papaver somniferum . | 6/35 | 10 × 2,8 ml | 9 | 2 | 5 | 5 |
| 6 | Moringa oleifera . . . | 5/25 | 1 × 10 ml | 5 | 3 | 2 | 2 |
| 7 | Moringa oleifera . . . | 5/25 | 1 × 10 ml | 2 | 0 | 2 | 1 |
| 8 | Moringa oleifera . . . | 5/25 | 1 × 10 ml | 2 | 0 | 2 | 1 |
| 9 | Moringa oleifera . . . | 4,2/32 | 5 × 3,6 ml | 9 | 2 | 3 | 3 |
| 10 | Moringa oleifera . . . | 2,4/35 | 11 × 3 ml | 4 | 0 | 3 | 3 |
| 11 | Sinapis alba . . . . . | 6,0/30 | 4 × 4,0 ml | 10 | 2 | 6 | 1 |
| 12 | Sinapis alba . . . . . | 3/32,5 | 4 × 2,75 ml | 10 | 3 | 4 | 4 |
| 13 | Sinapis alba . . . . . | 4,6/35,4 | 11 × 2,3 ml | 12 | 1 | 3 | 2 |
| 14 | Cleome gigantea . . . | 5/25 | 1 × 4,5 ml | 10 | 1 | 8 | 5 |

Bei den Ansätzen der Nr. 4, 10 und 13 wurden erforderliche Dialysezeit, Volumen der gewonnenen Albuminlösung und der Eiweißgehalt dieser Albuminlösung bestimmt und notiert. Außerdem wurde versuchsweise den Tieren, die mit diesen Ansätzen injiziert wurden, während der Injektionsperiode Omnadin verabfolgt in der Absicht, eine Verbesserung der Verträglichkeit und eventuell eine stärkere Antikörperbildung herbeiführen. Omnadin ist bekannt als ein Mittel der sog. „unspezifischen Reiztherapie". Es wirkt, wie die Kontrollversuche zeigten, nicht als Antigen und ruft, wie ebenfalls Kontrollversuche zeigten, keine Kontraktion am isolierten Meerschweinchenuterus hervor. Die für die drei Versuchsnummern erhaltenen Werte zeigt die Tabelle 2a.

*Tabelle 2a*

| Nr. | Endvolumen | Dialysezeit | Albumin in mg je Tier | Omnadin in ml je Tier |
|---|---|---|---|---|
| 4 | 34,7 ml | 24 Std | 0,0325 | 0,2 |
| 10 | 33,5 ml | 19 Std | 0,146 | 0,85 |
| 13 | 29 ml | 15 Std | 0,012 | 0,6 |

Die Bestimmung des Eiweißgehaltes der Albuminlösung wurde nach Kafka (1927) durchgeführt. Die in Kapillarröhrchen erzeugte Fällung mit Esbachlösung wurde in den graduierten unteren Teil der Kafka-Röhrchen zentrifugiert und volumetrisch gemessen. Die Umrechnung in mg erfolgt derart, daß Ovalbuminlösung bekannter Stärke der gleichen Behandlung unterworfen wurde. Die erhaltenen volumetrischen Werte

wurden dann mit einem Faktor auf mg umgerechnet. Es ist klar, daß derartige Bestimmungen nur ungefähre Anhaltspunkte über den Eiweißgehalt der Lösungen geben können.

In Tabelle 3 werden die Ansatz- und Erfolgszahlen der Tiergruppen, die mit alkohol-ätherextrahiertem Material injiziert wurden, der mit ätherextrahiertem Material behandelten Tiergruppen sowie der hier in Rede stehenden Gruppe einander gegenübergestellt.

Tabelle 3. *Erfolgszahlen für die Injektion mit verschieden behandeltem Antigenmaterial*

| | Äther-Alkohol-vorextraktion | Äther-vorextraktion | Albuminfraktion |
|---|---|---|---|
| Eingesetzte Versuchstiere . . . | 139 | 48 | 105 |
| Überlebende Tiere . . . . . | 88 | 22 | 81 |
| Sensible Tiere . . . . . | 68 | 10 | 56 |
| Fernsensible Tiere . . . . . | 23 | 3 | 36 |

Auffallend ist zunächst der größere Anteil an überlebenden Tieren. Das dürfte einmal darauf zurückzuführen sein, daß die Dialyse zugleich eine Reinigungsoperation darstellt, bei der unspezifische Schädlichkeiten entfernt werden. Außerdem ist anzunehmen, daß auch die relativ geringe Menge an Eiweiß, die trotz der häufig wiederholten Injektionen und der relativ hohen Einzelvolumina an Flüssigkeit, die gegeben wurden, mit für den verhältnismäßig hohen Teil an überlebenden Tieren verantwortlich ist. Wir haben für einige Antigenlösungen den relativen Anteil von Globulin und Albumin am Gesamtprotein durch Bestimmung nach der oben angegebenen Methode festgestellt. Danach beträgt das Verhältnis Globulin zu Albumin in etwa gleich konzentrierten Totalproteinlösungen von *Moringa oleifera* etwa 2,5:1 und bei *Papaver somniferum* etwa 5:1, im Mittelwert von je 10 Einzelbestimmungen. Der etwas geringere Anteil der sensiblen Tiere (bezogen auf die überlebenden Tiere) bei der Albumingruppe kann einmal auf die geringere serologische Aktivität der Albuminfraktion andererseits auch auf die verhältnismäßig geringen Eiweißmengen zurückzuführen sein.

Auffällig ist aber der sehr stark angestiegene Anteil fernsensibler Tiere bezogen auf die überhaupt sensiblen Versuchstiere. Während der Prozentsatz der fernsensiblen Tiere bezogen auf überhaupt sensible beim Äther-Alkohol-Material nur bei ungefähr 34% liegt, ist er beim fraktionierten Albuminmaterial auf über 65% gestiegen. Offenbar hat also die Fraktionierung des Materials den erwarteten und erwünschten Erfolg gezeitigt und offenbar ist auch gerade die Albuminfraktion Träger derjenigen Eiweißmerkmale oder mindestens vorwiegend Träger derjenigen Eiweißmerkmale, welche als familienverknüpfend für unsere Untersuchungen von besonderer Bedeutung sind.

### Die systematische Aussage der Reaktionen

Wenn wir nunmehr versuchen, die systematische Aussage der erhaltenen Reaktionen zu diskutieren, so sei nochmals bemerkt, daß das Ziel der Arbeit noch nicht die Aufstellung von systematischen Zusammenhängen innerhalb der *Rhoeadales* oder dieser Familiengruppe mit anderen Familien außerhalb ihres Bereiches war. Vielmehr wurde lediglich das Ziel verfolgt, von einem willkürlich gewählten systematischen Gebiet aus das Problem der Erzielbarkeit interfamiliärer serologischer Reaktionen überhaupt zu behandeln. Die Wahl der einzelnen Antigenmaterialien erfolgte daher auch durchweg nicht unter dem Gesichtswinkel bestimmter systematischer Probleme, sondern meist unter demjenigen der Beschaffbarkeit des Materials.

Hinsichtlich unseres Zieles wären nun folgende Ergebnisse möglich:

1. Interfamiliäre Reaktionen hätten bei einwandfreier Arbeitsweise überhaupt nicht auftreten können. Wie erwähnt, ist das Gegenteil der Fall.

2. Die Reaktionen konnten ohne Zusammenhang mit der systematischen Zugehörigkeit und Verwandtschaft der Stammpflanzen unseres Antigenmaterials auftreten, solche „asystematische" Reaktionen eventuell ebenso häufig oder sogar häufiger auftreten als systemgemäße. Auch das war keineswegs der Fall. Vielmehr sind bei den daraufhin besonders geprüften Antialbumin-Sensibilitäten alle Reaktionen mit Leguminosen *(Vicia Faba, Phaseolus vulgaris)*, Dilleniaceen *(Dillenia indica)*, Moraceen *(Cannabis sativa)*, Cucurbitaceen *(Cucurbita Pepo)*, Coniferen *(Pinus Cembra)* negativ ausgefallen. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang lediglich je eine Reaktion mit *Cucurbita Pepo* und *Datura Stramonium*. Hier hat nach Berührung mit dem Antigen eine Dauerkontraktion der Muskulatur beobachtet werden können, so daß Absättigungsprüfungen und Anstellung weiterer Reaktionen unterbleiben mußten. In einem anderen Falle ist noch eine zweifelhafte, sehr schwache Reaktion mit *Cucurbita Pepo* (von Anti-*Papaver* aus) aufgetreten. Ob sie im Sinne eines — systematisch diskutierbaren — Zusammenhanges zwischen *Rhoeadales* und *Cucurbitales* zu werten ist, erscheint uns unmöglich zu entscheiden, zumal im Hinblick auf die typisch unspezifische Reaktion eines Anti-*Moringa*systems mit dem gleichen Material.

3. Die Reaktionen konnten sich auf einen systematischen Bereich beschränken, dessen Familien offensichtliche verwandtschaftliche Beziehungen untereinander aufweisen und innerhalb dieses Bereiches bestimmte Zusammenhänge bevorzugt hervortreten lassen. Dieser Fall erscheint nun in unseren Reaktionen verwirklicht zu sein. Inwieweit dies zutrifft, ist nunmehr zu diskutieren.

Wir sehen davon ab, jeden Einzelversuch, der überhaupt Fernreaktionen ergab, protokollarisch wiederzugeben. Vielmehr begnügen wir

uns damit, für einen einzelnen bezeichnenden Versuch das auf der Trommel des Kymographen aufgezeichnete Bild der Bewegungen des sensiblen Uterushorns eines Versuchstieres wiederzugeben, daran nochmal das Wesen der Versuchsanstellung und der Versuchskontrolle zu erläutern und dann in einer Übersicht die Reaktionen fernsensibler Tiere zusammenzufassen.

Abb. 1 zeigt die Reaktionen eines der beiden Uterushörner des Versuchstieres II B 64a. Zur Sensibilisierung diente Samenmaterial von *Papaver somniferum*, das mit Äther und Alkohol wie üblich extrahiert worden war. Es enthielt neun Injektionen zu je 2 ml, Ansatzverhältnis 1:50. Die Inkubationszeit betrug 90 Tage. Die zur Reaktion angebotenen Antigene waren Suspensionen (je 2 ml bei einem Volum des

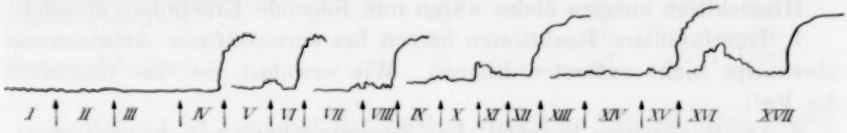


Abb. 1. Reaktionen eines Uterushornes eines Anti-*Papaver*-Tieres. (Weitere Erläuterungen im Text)

Muskelbades von etwa 160 ml) von ätherextrahiertem Material, dessen Ansatzkonzentration 0,1 g : 10 ml betrug. Der Zusatz zum Muskelbad erfolgt stets durch Einpipettieren unmittelbar über dem Austritt der Luftzufuhrleitung, wodurch schnelle Vermischung mit dem Gesamtvolumen der Badflüssigkeit gewährleistet ist. Bei I erfolgte Zusatz von *Akebia quinata*, bei ↑ Spülung des Bades mit Tyrodelösung von 37° C (gleiche Bedeutung des aufrecht stehenden Pfeiles für die Folge), II *Reseda alba*, III *Moringa oleifera*, IV *Cleome spinosa*. Nunmehr erfolgt deutliche, kräftige Reaktion (positive Reaktion: +). V Wiederholung des Angebotes von *Cleome*-Antigen an den wieder erschlafften Muskel, keine Reaktion (—), also Absättigung eingetreten, VI *Sisymbrium strictum* +, VIII *Iberis amara* +, X *Corydalis glauca* —, XI *Sanguinaria canadensis* —, XII *Glaucium corniculatum* +, XIV *Chelidonium majus* —, XV *Papaver somniferum* +, XVII Tenosin +. Durch die kräftige Kontraktion nach Tenosin wird bewiesen, daß die nur sehr schwache Kontraktion nach der zweiten *Papaver*gabe nicht auf Ermüdung des Muskels (allgemeine Unfähigkeit zur Kontraktion), sondern auf spezifischer Absättigung durch das homologe Antigen beruht. Die jeweils nach einer positiven Reaktion wiederholte Gabe des gleichen Antigens (in der Aufzählung von VIII an ausgelassen) nach Erschlaffung des Muskels stellte eine Prüfung auf die Spezifität der vorangegangenen Reaktion dar. Ihr negativer Ausfall beweist, daß die erste Reaktion auf einer der Absättigung fähigen spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, nicht auf unspezifischer Reaktion gegenüber einem Muskelgift, die

wiederholbar sein würde. Das Parallelhorn des gleichen Tieres reagierte wie folgt (Reaktionen zum Absättigungsnachweis auch im folgenden fortgelassen): *Caltha palustris* —, *Hydrastis canadensis* —, *Podophyllum emodi* —, *Berberis vulgaris* —, *Akebia quinata* —, *Reseda Luteola* —, *Cleome violacea* +, *Sisymbrium strictissimum* —, *Chelidonium majus* +, *Papaver somniferum* +, Tenosin +.

Wollte man — was nicht unsere Absicht ist — aus den Reaktionen eines einzigen derartigen Tieres systematische Schlüsse ziehen, so würden sich die folgenden ergeben: *Ranunculaceen*, *Berberidaceen*, *Reseduceen* und *Moringaceen* haben entweder keine oder jedenfalls wesentlich weniger ausgeprägte Partigengemeinschaft mit *Papaver* als *Capparidaceen* und *Cruciferen*. Die Partigengemeinschaft mit den *Cruciferen* ist solcherart, daß mindestens ein Teil von ihr nicht zugleich Partigene betrifft, die *Papaver* mit *Capparidaceen* gemeinsam hat. Und schließlich enthalten *Glaucium* und *Chelidonium* offenbar noch besondere Partigengemeinsamkeit mit *Papaver*. Möglicherweise sind diese Partigene bei beiden untersuchten *Papaveraceen* die gleichen. Außerdem aber enthält Papaver offensichtlich Teilantigene, die in keiner der vorher zur Reaktion angebotenen species vorkommen. Die zur Abbildung gebrachten Reaktionen des einen Uterushornes dieses Versuchstieres bieten ein Beispiel für besonders reichhaltige Abbildung des Partigensystems des Injektionsantigens durch das sensible System. Derartige reichhaltige Abbildung ist keineswegs die Regel. Daß die beiden Uterushörner des gleichen Tieres nicht immer die gleiche Reichhaltigkeit der Abbildung zeigen, ist eine aus früheren Arbeiten bereits geläufige Erscheinung, die auch in der allgemeinserologischen Literatur erwähnt wird (Doerr 1951).

Wir geben nunmehr Übersichten über die nach derartiger Methodik erhaltenen interfamiliären Reaktionen, wobei wir von den einzelnen mit gleichartigem Antigenmaterial vorbehandelten Tiergruppen ausgehen. In die Tabellen werden jeweils nur diejenigen Reaktionsantigene aufgenommen, mit denen überhaupt positive Reaktionen erhalten wurden. Diejenigen Reaktionsantigene, mit denen nur negative Reaktionen erhalten wurden, obwohl sie mehrfach in der Reaktionsreihenfolge so gegeben wurden, daß bei Bestehen von Partigengemeinschaft eine positive Reaktion hätte erhalten werden müssen (also vor den in die Tabelle aufgenommenen Reaktionsantigenen), werden im Anschluß an die Tabelle aufgezählt. Die Summe der gegen die einzelnen Antigene sensiblen Tiere braucht selbstverständlich nicht mit der Summe der fernsensiblen oder überhaupt sensiblen Tiere übereinzustimmen, da manche Tiere Reaktionen mit zwei verschiedenen Antigenen gegeben haben. Das kann sowohl am gleichen Muskelpräparat wie am Parallelhorn der Fall gewesen sein. In den Tabellen wird aber keine Rücksicht darauf genommen, ob ein und dasselbe Tier mehrere interfamiliäre Reaktionen am gleichen

Uterushorn oder am zweiten Uterushorn desselben Tieres gegeben hat. Die Zahlen bei den einzelnen Reaktionsantigenen bedeuten stets die Anzahl der gegen dieses Antigen sensiblen Tiere, nicht die Zahl der erhaltenen Reaktionen. Wenn also z. B. ein Anti-*Papaver*-Tier an beiden Uterushörnern je eine Reaktion z. B. mit *Moringa* gegeben hat, so wird dieses Tier nur einmal aufgeführt.

Tabelle 4. *Anti-Papaver somniferum*

| Injektionsantigen | Sensible Tiere | Fern-sensible Tiere | Davon sensibel gegen | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Cleome gigantea | Moringa oleifera | Sinapsis alba |
| Mit Äther und Alkohol vorextrahiert . . . . . | 9 | 3 | 1[1] | 1 | 1 |
| Mit Äther vorextrahiert . | 7 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Alkoholisches Extrakt . . | 14 | 3 | 0 | 2 | 2 |
| Mit Alkohol digeriert . . | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Albumin . . . . . | 15 | 14 | 2 | 10(11) | 6(10) |

*Anmerkung zur Tabelle:* Eingeklammerte Zahlen bedeuten, daß die Zahl der positiven Reaktionen sich auf diese Zahl erhöht hätte, wenn schwache Reaktionen mitgerechnet worden wären.

Zwei zweifelhafte Reaktionen wurden mit *Cucurbita Pepo* erhalten, keine Reaktionen wurden erhalten mit *Vicia Faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Dillenia indica*, *Cannabis sativa*, *Pinus Cembra*, aber auch keine mit *Hypericum perforatum*, *Paeonia officinalis*, *Akebia quinata*, *Berberis vulgaris* und *Reseda odorata* als von Vertretern solcher Familien, die grundsätzlich als zur weiteren Verwandtschaft der *Rhoeadales* oder sogar zu

Tabelle 5. *Weitere Papaveraceen-Zentren mit Material nach Vorextraktion mit Äther und Alkohol*

| Injektionsantigene | Sensible Tiere | Fern-sensible Tiere | Cleome graveolens | Iberis amara |
|---|---|---|---|---|
| Chelidonium majus . . | 5 | 1 | 1 | 1 |
| Glaucium flavum . . . | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Sanguinaria canadensis | 2 | 0 | 0 | 0 |

den *Rhoeadales* gerechnet werden können. *Fumaria officinalis* wurde nur an Sensibilitäten geprüft, die gegen äther-alkoholextrahiertes Material von *Papaver* gerichtet waren. Es wurde in keinem Fall eine Reaktion erhalten, auch nicht an einem Tier, das mit *Sinapis alba* eine deutliche Reaktion ergab, und obwohl der Zusatz von *Fumaria*-Material vor der Zugabe von *Sinapis*-Material erfolgte.

[1] Reaktionsantigen hier: *Cl. spinosa.*

Außer den in die Tabelle aufgenommenen Reaktionsantigenen wurden weitere *Capparidaceen* und *Cruciferen*, ferner *Caltha palustris*, *Hydrastis canadensis*, *Podophyllum emodi*, *Nandina domestica*, *Berberis vulgaris*, *Akebia quinata*, *Reseda alba*, *Reseda Luteola*, *Moringa oleifera* als Reaktionsantigene geboten. In keinem Fall wurden positive Reaktionen erhalten, jedes der aufgeführten Versuchstiere gab positive Reaktionen innerhalb der Gruppe der *Papaveraceen*, wieder aber mit Ausnahme von *Fumaria officinalis*. Auf die Reaktionen innerhalb der *Papaveraceen* wird jedoch hier nicht eingegangen.

Tabelle 6. *Anti-Moringa oleifera*

| Injektionsantigene | Sensible Tiere | Fernsensible Tiere | Sensibel gegen | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Chelidonium majus | Papaver somniferum | Sisymbrium strictissimum | Sinapis alba | Cleome gigantea | Reseda odorata | Hypericum perforatum |
| Mit Äther und Alkohol vorextrahiert . . | 7 | 4 | 0 | 2 (3) | 2 (2) | — | 0 | 0 | — |
| Mit Äther vorextrahiert . . | 2 | (2) | (1) | 0 | — | (1) | 0 | — | — |
| Albumin . . . | 12 | 10 | (1) | 9 | — | 5 | 2 | 3 (4) | 1 |

Ein Strich in den Tabellen bedeutet, daß in dieser Gruppe von Tieren Reaktionen mit dem betreffenden Reaktionsantigen nicht angestellt wurden. Im übrigen wurden gegen Anti-*Moringa oleifera*-Tiere die

Tabelle 7. *Reaktionen von Cruciferen-Zentren*

| Injektionsantigene | Sensible Tiere | Fernsensible Tiere | Sensibel gegen | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Capparis inermis | Cleome gigantea | Moringa oleifera | Reseda odorata | Papaver somniferum | Chelidonium majus |
| *Sinapis alba* (Äther + Alkohol) . . . . . | 7 | 5 | 4 | 0 | ? | 0 | 0 | 0 |
| *Sinapis alba* Albumin . | 9 | 7 | 0 | 0 | 6 | 1 (2) | 2 | 1 |
| *Sisymbrium austriacum* (Äther + Alkohol) . | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 8. *Reaktionen von Capparidaceen-Zentren*

| Injektionsantigene | Sensible Tiere | Fernsensible Tiere | Sisymbrium austriacum | Sinapis alba | Moringa oleifera | Papaver somniferum | Reseda odorata |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Cleome spinosa* (Äther + Alkohol) . . . . . | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Cleome gigantea* Albumin . . | 5 | 5 | — | 2 | 5 | 1 | (1) |

gleichen Antigene wie in den vorigen Tabellen angegeben geprüft, ohne daß weitere positive Reaktionen erhalten worden wären. Alle erhaltenen negativen Reaktionen waren methodisch einwandfrei.

Die Reaktionen gegenüber allen übrigen zur Reaktion angebotenen Antigenen (abgesehen von *Cruciferen*) waren negativ. Die mit einem Fragezeichen versehene Reaktion mit *Moringa* erscheint aus methodischen Gründen zweifelhaft, da keine Absättigungsreaktion zu erhalten war.

Alle übrigen zur Reaktion angebotenen Antigene (abgesehen von *Capparidaceen*) ergaben nur einwandfreie negative Reaktionen.

Tabelle 9. *Reaktionen von Resedaceen- und Berberidaceen-Zentren*

| Injektionsantigene | Sensible Tiere | Fernsensible Tiere | Reaktionen mit | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Hydrastis canadensis | Chelidonium majus | Papaver somniferum | Cleome spinosa | Sisymbrium strictissimum |
| *Reseda Luteola* (Äther + Alkohol) . . . . . | 2 | 1 (2) | 0 | (1) | 0 | 1 | 0 |
| *Reseda alba* (Äther + Alkohol) | 3 | 3 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 |
| *Berberis vulgaris* (Äther + Alkohol) . . . . . | 6 | 1 | 0 | — | 1 | 0 | 0 |

Alle übrigen geprüften Antigene aus anderen Familien lieferten einwandfreie negative Reaktionen. Prüfungen auf „asystematische" Reaktionen fanden aber bei diesen Zentren nicht statt.

Zur Ergänzung werden noch in einer weiteren Tabelle unveröffentlichte Ergebnisse mitgeteilt, die 1934 mit Injektionsmaterial erhalten wurden, das lediglich mit Äther und Petroläther extrahiert worden war. Injiziert wurden in jedem Falle einmal 1 ml einer Antigensuspension 0,2/10 und 25 Tage später noch einmal 2 ml 0,6/20. Nach dieser zweiten Injektion starb ein Teil der Tiere. Jedoch ist die Zahl der überhaupt eingesetzten Tiere und die Zahl der überhaupt sensiblen Tiere nicht mehr rekonstruierbar.

Tabelle 10. *Erste interfamiliäre Reaktionen bei Rhoeadales (1934)*

| Injektionsantigene | Sensible Tiere | Fernsensible Tiere | Reaktionen mit | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Podophyllum emodi | Reseda alba | Corydalis cava | Chelidonium majus | Raphanus sativus |
| Chelidonium majus . . . . . | ? | 7 | 1 | 0 | 1 (3) | 7 | 4 |
| Raphanus sativus . . . . . | ? | 1 | — | 1 | — | 0 | 1 |

Die systematische Aussage der im vorhergehenden mitgeteilten interfamiliären Reaktionen ist nunmehr zu diskutieren. Grundsätzlich läßt die von uns verwendete Methode der Absättigungsreaktionen an anaphylaktisch sensiblen Organen verschiedene Möglichkeiten der Aussage über die Antigengemeinschaft verschiedener Organismen zu. Es kann mit erheblichem Grad an Sicherheit das *Bestehen einer solchen Gemeinschaft* festgestellt werden. Mit größerer Unsicherheit wird immer die Aussage belastet sein, daß zwischen zwei Organismen keine Partigengemeinschaft besteht. Denn es ist denkbar, daß bei Einsatz einer größeren Anzahl von Versuchstieren oder bei weiterer Variation der Versuchsbedingungen doch noch irgendwann positive Reaktionen erhalten werden könnten. Entsprechendes gilt selbstverständlich für die in diesem Zusammenhange weniger interessierende Frage des Vorliegens unterscheidender Partigene oder Protene, eine Frage, die bei der Untersuchung nahe verwandter Organismen von großer Bedeutung ist. Dann kann die Frage des *Grades der Verwandtschaft* erörtert werden. Unsere Methode ist ja dem Wesen nach allerdings eine qualitative Methode. Die einzige Möglichkeit, aus Reaktionen dieser Form quantitative Schlüsse über den Verwandtschaftsgrad abzuleiten, könnte vielleicht in einem Vergleich der Zahl der unter sonst vergleichbaren Bedingungen und an vergleichbar zahlreichem Versuchstiermaterial erhaltenen positiven Reaktionen bestehen (s. w. u.). In der bereits früher betonten Beschränkung auf im wesentlichen qualitative Aussagen liegt andererseits die Stärke der Absättigungsreaktion am anaphylaktischen Meerschweinchen. Denn auf ihr beruht weiterhin die Möglichkeit, *Formen der Partigengemeinschaft* festzustellen. Die Methode, die zu derartigen Feststellungen führen kann, ist die Variation der Reaktionsreihenfolgen, wobei unter Umständen sich erweisen kann, daß die Reaktion eines Antigens A mit dem Immunsystem Anti-B nicht mehr stattfindet, wenn vorher das Reaktionsantigen C eingewirkt hat. Das Ergebnis derartiger Versuchsanstellung können sog. Protenomkarten sein, wie sie z. B. in der Bastardserologie entwickelt wurden (vgl. Moritz u. vom Berg 1931, Moritz 1931, 1933). Es wäre sicher unangemessene Voreiligkeit, wenn wir nach den hier vorgelegten Reaktionsergebnissen versuchen würden, eine Auswertung in dem zuletzt genannten Sinne vorzunehmen. Das wäre nur möglich, wenn nach entsprechenden Vorversuchen planmäßig variierte Reaktionsreihenfolgen untersucht würden. Dann allerdings erscheint es möglich, auch auf dem Gebiet der Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse von Familien zueinander zur Feststellung von Formen der Partigengemeinschaft zu kommen. Wollten wir unser Reaktionsmaterial in dieser Richtung auswerten, dann könnte es sich allenfalls um die Aufstellung von Thesen handeln, deren planmäßige Nachprüfung späterer Untersuchung vorbehalten bleiben müßte. Ein solches Unternehmen kann jedoch als

fruchtbar angesehen werden nach dem, was wir in systematischer Hinsicht als gesichertes Ergebnis unserer Versuche ansehen können. Als dieses Ergebnis betrachten wir die Aussage, daß sichere positive Reaktionen zwischen Gattungen und Arten verschiedener Familien ausschließlich bei Reaktionen zwischen Systemen erzielt wurden, die zu Familien der Reihe der *Rhoeadales* gehören, oder deren systematische Verwandtschaft mit den *Rhoeadales* jedenfalls diskutierbar ist oder diskutiert wurde. In keinem einzigen der vielen Fälle, in denen wir die Möglichkeit zur asystematischen Reaktion herbeiführten, ist eine solche erhalten worden. Unter diesen Umständen halten wir es für berechtigt, eine Gegenüberstellung der von uns festgestellten Eiweißgemeinschaften zwischen verschiedenen Familien und den in gleicher Richtung erzielten Ergebnissen der betreffenden Untersucher aus der Königsberger Schule vorzulegen: Zu diesem Zwecke fassen wir zunächst die von uns nachgewiesenen serologischen Familienverknüpfungen noch einmal unter Außerachtlassung der Gattungs- und Artzugehörigkeit der reagierenden Antigenmaterialien in einer Tabelle zusammen (Tabelle 11).

Schwach positive Reaktionen sind in dieser Tabelle nur soweit aufgenommen, wie ohne ihre Berücksichtigung die Zahl der positiv reagierenden Tiere unter 5 gelegen hätte. Setzt man diese durch unsere Reaktionen erreichten serologischen Anschlüsse verschiedener Familien aneinander in Beziehung zu den Aussagen der Königsberger Untersucher Gohlke (1913), Preuss (1917) und Lange (1924), so ergibt sich, daß wir die folgenden positiven Reaktionen der Königsberger Arbeiten nicht verzeichneten (erster Partner jedes Paares jeweils das Injektionsmaterial oder „Zentrum"): *Papaveraceae–Resedaceae*, *Cruciferae–Berberidaceae*, *Cruciferae–Magnoliaceae*, *Capparidaceae–Resedaceae*, *Capparidaceae–Berberidaceae*, *Resedaceae–Moringaceae*, *Resedaceae–Berberidaceae*, *Berberidaceae–Cruciferae*, *Berberidaceae–Capparidaceae*. Andererseits waren die folgenden Anschlüsse bei uns erreichbar, die in den Königsberger Arbeiten fehlen: *Papaveraceae–Cruciferae*, *Cruciferae–Papaveraceae*, *Cruciferae–Moringaceae*, *Moringaceae–Cruciferae*, *Resedaceae–Ranunculaceae*, *Berberidaceae–Papaveraceae*.

Von den neun Fällen, in denen bei uns positive Reaktionen im Gegensatz zu den Königsberger Arbeiten ausblieben, betreffen sechs Anschlüsse, die aus dem Bereich der *Rhoeadales* hinausreichen in den der *Polycarpicae*. In den beiden anderen Fällen wurden jedoch von uns die Anschlüsse in anderer Reaktionsrichtung („Zentrum" und Reaktionsantigen vertauscht) erhalten.

Von den sechs Fällen der zweiten Gruppe mangelnder Übereinstimmung betreffen zwei Anschlüsse zwischen *Rhoeadales* und *Polycarpicae*, die wir erhielten, während die Königsberger Arbeiten sie nicht aufweisen. Die restlichen vier Fälle betreffen Verhältnisse innerhalb der *Rhoeadales*.

*Tabelle 11*

| Familienpaare | Positive Reaktionen Tierzahl | Davon entfallen auf | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Familie („Zentrum") | Tierzahl | Familie („Zentrum") | Tierzahl |
| Papaveraceae–Cruciferae | 17 | Papaveraceae | 14 | Cruciferae | 3 |
| Papaveraceae–Capparidaceae | 6 | Papaveraceae | 5 | Capparidaceae | 1 |
| Papaveraceae–Moringaceae | 25 | Papaveraceae | 14 | Moringaceae | 11 |
| Papaveraceae–Resedaceae | 4(6) | Papaveraceae | 1 | Resedaceae | 3(5) |
| Papaveraceae–Fumariaceae | 1(3) | Papaveraceae | 1(3) | Fumariaceae | — |
| Papaveraceae–Berberidaceae | 1(2) | Papaveraceae | (1) | Berberidaceae | 1 |
| Cruciferae–Capparidaceae | 10 | Cruciferae | 7 | Capparidaceae | 3 |
| Cruciferae–Moringaceae | 15 | Cruciferae | 6 | Moringaceae | 9 |
| Cruciferae–Resedaceae | 3(4) | Cruciferae | 2(3) | Resedaceae | 1 |
| Capparidaceae–Moringaceae | 7 | Capparidaceae | 5 | Moringaceae | 2 |
| Capparidaceae–Resedaceae | 2(3) | Capparidaceae | (1) | Resedaceae | 2 |
| Moringaceae–Resedaceae | 3(4) | Moringaceae | 3(4) | Resedaceae | — |
| Moringaceae–Hypericaceae | 1 | Moringaceae | 1 | Hypericaceae | — |
| Resedaceae–Ranunculaceae | 1 | Resedaceae | 1 | Ranunculaceae | — |

Und zwar ist hier von uns das Bestehen von Partigengemeinschaft zwischen *Moringaceen* und *Cruciferen* einerseits und *Papaveraceen* und *Cruciferen* andererseits jeweils durch reziproke Reaktionen völlig eindeutig nachgewiesen worden, während in Königsberg auffälligerweise diese Versuche in beiden Fällen reziprok negativ ausfielen. Wir möchten das darauf zurückführen, daß wir ein sehr viel umfangreicheres Tiermaterial einsetzten, und auf die Begünstigung der Fernreaktionen durch Verwendung der Albuminfraktion. Insgesamt ergibt sich eine beachtenswerte Übereinstimmung in der Aussage, daß auch vom serologischen Standpunkt die *Rhoeadales* eine durchaus natürliche Vereinigung von Familien zu einer Reihe darstellen. Bezüglich der Beziehungen dieser Reihe zu anderen Reihen möchten wir uns auf die sehr vorsichtige Feststellung beschränken, daß sich allenfalls Andeutungen solcher Beziehungen ergaben, die zu weiteren Bemühungen in dieser Richtung ermutigen. Diese Beschränkung in der Aussage erscheint uns geboten,

obwohl die einzelnen — aber auch stets vereinzelten — positiven Reaktionen, die für solche Beziehungen sprechen, keinerlei Anzeichen boten, daß sie nicht methodisch einwandfrei wären.

Es wäre verlockend, aus den Zahlenverhältnissen der positiven Reaktionen, die in Tabelle 11 zusammengefaßt wurden, Schlüsse zu ziehen auf den *Verwandtschaftsgrad* der einzelnen Familien innerhalb der *Rhoeadales*. Jedoch stehen einer derartigen Auswertung grundsätzliche Bedenken entgegen, selbst wenn man die Zahl der positiven Reaktionen auf die Zahl der gebotenen Reaktionsmöglichkeiten beziehen, also ihre relative Häufigkeit einsetzen würde. Die relative Häufigkeit des Auftretens positiver Reaktionen ist zunächst zweifellos lediglich eine Folge entweder der Mengenverhältnisse, in denen die den verglichenen Arten gemeinsamen Partialantigene zum Gesamtpartigenbestand stehen, oder ein Ausdruck ihrer qualitativ verschiedenen serologischen Aktivität. Daß der zuletzt genannte Faktor für Aussagen über Verwandtschaftsgrade nicht in Betracht kommt, ist selbstverständlich. Aber auch die Mengenverhältnisse sind für seine Beurteilung ungeeignet. Denn der Verwandtschaftsgrad zweier Organismen bestimmt sich nicht nach der Quantität, in der ein einzelnes Merkmal auftritt, sondern nach der Zahl qualitativ voneinander unterscheidbarer gemeinsamer Merkmale. Es besteht kein Grund, dieses Prinzip, das für den morphologischen Verwandtschaftsvergleich selbstverständlich ist, aufzugeben, wenn der Vergleich auf chemische, serologisch erfaßte Merkmale gegründet wird. Diese Erwägungen sind bereits früher (Moritz 1932) in etwas anderer Formulierung ausführlich dargelegt worden und führen also zu einer Ablehnung definitiver Aussagen über Verwandtschaftsgrade auf Grund von Reaktionsstärken oder von Reaktionshäufigkeiten. Daß ein positiver Reaktionsausfall relativ häufig eintritt oder quantitativ relativ beträchtlich ist, kann sowohl auf der großen Anzahl gemeinsamer Partigene beruhen wie auf den beträchtlichen Anteil nur eines gemeinsamen Partialantigens an Gesamtproteinbestand der untersuchten Organismen oder Organe. Ob der erste Fall, der für nahe Verwandtschaft sprechen würde, oder der zweite, bei dem relativ geringer Verwandtschaftsgrad vorliegen würde, im Einzelfall verwirklicht ist, kann nur durch die qualitative Protenomanalyse im serologischen Absättigungsversuch entschieden werden. Insofern steht unsere Auffassung im Gegensatz zu der von der Mehrzahl der vergleichenden Serologen befolgten Praxis, was sowohl für die Arbeiten der Königsberger phytoserologischen Schule wie für die zooserologischen Arbeiten aus der Schule Boydens (1942, 1954) gilt. Quantitativ beträchtlicher oder häufig eintretender positiver Ausfall einer serologischen Reaktion ist für uns vornehmlich Begründung der Sicherheit der aus dieser Reaktion abgeleiteten Aussage. Außerdem kann er Anlaß zur Durchführung echter Protenomanalysen zur eigent-

lichen Entscheidung über Fragen des Verwandtschaftsgrades und damit zugleich der Verwandtschaftsform sein. Von geringer Reaktionsstärke oder seltenem Auftreten einer Reaktion gilt begreiflicherweise Entsprechendes.

Besondere Betrachtung verdienen zweifellos die positiven Reaktionen, die von Albuminzentren her erhalten wurden. Daß mit dieser Art von Injektionsantigenen ein besonders hoher Anteil an fernsensiblen Versuchstieren erhalten wurde, könnte man lediglich mit der Annahme zu erklären versuchen, daß eben die verhältnismäßig geringen Anteile der familienverknüpfenden Eiweißmerkmale am Gesamtprotein infolge der quantitativen Konkurrenz der Antigene seltener zur Abbildung gelangen als die übrigen, einerlei, ob die familienverknüpfenden Partialantigene der Globulin- oder Albuminfraktion angehören. Nehmen wir willkürlich an, daß in beiden Fraktionen eines Organauszuges je ein kleiner Anteil der Gesamtfraktion in zwei Organismen gemeinsam vorkäme. Dieses Mengenverhältnis möge ferner bereits zu beachtlicher Unterdrückung der Abbildung dieser Anteile in den sensiblen Systemen führen. Dann wird einfache Aufspaltung des Gesamtproteins in die beiden Fraktionen die Aussichten für Abbildung der familienverknüpfenden Proteine in einem Immunsystem wesentlich verbessern, da sie nun nur noch der Konkurrenz von seiten der Proteine der eigenen Fraktion, aber nicht mehr der anderen Fraktion ausgesetzt sind.

In den hier mitgeteilten Fällen gewinnt man aber doch den Eindruck, als ob insbesondere die Albuminfraktion Sitz familienverknüpfender Partialantigene sei. Denn sowohl bei den mit Totalextrakten wie bei den nur mit Albuminfraktion gespritzten Tiergruppen traten Sensibilitäten gegen Proteine anderer Familien nur höchst selten nach minimalen Inkubationszeiten, vielmehr in der Regel nach solchen Inkubationszeiten auf, die wesentlich länger waren als die üblichen Minimalinkubationszeiten. Daß die Albuminfraktion eher zur Verknüpfung auch entfernter verwandter systematischer Einheiten geeignet ist, geht auch schon aus den erwähnten Versuchen von Chester (1937) an *Solanaceen* hervor. Eine auffällige Parallelbeobachtung ergibt sich aus den zooserologischen Arbeiten von Boyden u. Gemeroy (1950). Sie fanden, daß Antiseren gegen Rindereiweiß bei relativ hohem Albumingehalt des Injektionsantigens systematisch weiterreichende Reaktionen gaben als solche gegen Injektionsantigene mit relativ niedrigem Antialbumingehalt. Auch die Arbeiten von Cohen (1953/54) mit Reptilienantigenen zeigen, daß einerseits weiterreichende Reaktionen erst nach längerer Inkubationszeit zu erreichen waren und daß ferner in den ersten Phasen der Immunisierung die Globuline stärkere Antigenaktivität zeigten als die Albumine. Nach diesen in gleicher Richtung weisenden Ergebnissen an so verschiedenem Antigenmaterial, wie es durch tierische

Seren, pflanzliches Sproßmaterial von Solanaceen und Samenproteine von *Rhoeadales* repräsentiert wird, hat man also mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Albuminfraktion hinsichtlich ihrer serologischen Ausprägung allgemein eine Sonderstellung für die vergleichende serologische Verwandtschaftsforschung einnehmen könnte.

Während diese etwaige Sonderstellung der Albuminfraktion als Träger verwandtschaftsserologisch besonders interessanter Merkmale uns bei der Erzielung der experimentellen Ergebnisse völlig rätselhaft erscheinen mußte, ist heute vielleicht eine Erklärung vom eiweißchemischen Standpunkt aus denkbar. Denn Karush (1954) kommt nach seinen Untersuchungen über die Farbstoffaufnahme von menschlichem Blutalbumin zu der Auffassung, daß die Anziehungskräfte zwischen den einzelnen α-Helix-Spiralen bei den Albuminen im Vergleich zu anderen Proteinarten verhältnismäßig schwach sind. So soll es bei den Albuminen verhältnismäßig leichter zu einer Trennung der einzelnen α-Helix-Spiralen voneinander kommen unter Bedingungen, welche für andere Proteine dazu noch nicht ausreichen. Man könnte sich also immerhin vorstellen, daß eine solche besondere Neigung der Albuminmoleküle zum „unfolding" zugleich die Darbietung einer größeren Merkmalsmannigfaltigkeit für die serologischen Vorgänge bedeutet. Allerdings sind unseres Wissens an pflanzlichem Material Untersuchungen, welche denen von Karush an tierischem oder an menschlichem Albumin entsprechen, noch nicht durchgeführt worden. Und endlich wird es nötig sein, das in unseren Untersuchungen fehlende experimentum crucis durchzuführen, das in der Injektion der abgetrennten Globulinfraktion und der Untersuchung der dann entstehenden Sensibilitäten auf Fernreaktionen bestehen würde. Erst dann wäre auch die Möglichkeit gegeben, vom phytoserologischen Standpunkt her Stellung zu nehmen zu der von Boyden, de Falco u. Gemeroy (1950) aufgestellten These des Parallelismus der Entwicklung der Eiweißfraktionen, wonach ein serologisch nachweisbarer Unterschied an den Albuminfraktionen zweier tierischer Seren stets von einer korrespondierenden Änderung in der Globulinfraktion begleitet sein soll.

## Zusammenfassung

1. Es werden die Möglichkeiten zur Erzielung von serologischen Reaktionen zwischen Angehörigen verschiedener Familien im Bereich der Rhoeadales und unter Verwendung des Anaphylaxieversuchs in der Form von Schultz und Dale untersucht.

2. Von geringem praktischen Einfluß waren Änderungen in der Methode der Vorextraktion des zu injizierenden Antigenmaterials.

3. Jedoch bewirkt die Vorbehandlung des Materials mit heißem Alkohol im Soxlethapparat zweifellos eine Verarmung des extrahierten Materials an serologisch wirksamem Eiweiß. Denaturierung und Heraus-

lösung von Antigenmaterial sind daran beteiligt. Neue Spezifitäten infolge von Denaturierung waren nicht nachweisbar.

4. Fernreaktionen von Tieren, die mit Totalproteinextrakten oder Suspensionen injiziert waren, treten selten und nur nach mehrfach wiederholten Injektionen und nach verhältnismäßig langer Inkubationszeit auf.

5. Der Anteil fernsensibler Tiere am Gesamtmaterial steigt beachtlich, wenn an Stelle von Totalextrakten nur die Albuminfraktion der Extrakte injiziert wird. Das Erfordernis wiederholter Injektionen und langer Inkubationszeit bleibt auch dann bestehen.

6. Nach den erhaltenen interfamiliären Reaktionen erweisen sich die als *Rhoeadales* zusammengefaßten Familien als eine natürliche Gruppe. Auf mögliche Beziehungen zu den Reihen der *Polycarpicae* und der *Guttiferales (Hypericum)* deuteten sehr wenige positive Reaktionen, die noch der Wiederholung und Bestätigung bedürfen.

7. Ein Vergleich mit den Reaktionen von Königsberger Voruntersuchern gab sehr weitgehende Übereinstimmung.

8. Allgemeine Probleme der Auswertung serologischer Reaktionen für Zwecke der Verwandtschaftsforschung werden diskutiert und besonders das Problem der eventuellen Sonderstellung der Partigene der Albuminfraktion näher betrachtet.

## Literatur

Arzt, H.: Serologische Untersuchungen über die Verwandtschaftsverhältnisse der Gerste mit besonderer Berücksichtigung des Eiweißausgleiches innerhalb der präzipitierenden Lösungen. Bot. Archiv **13**, 117—148 (1926). — Baum, W.: Systematic serology of the family Cucurbitaceae with special reference to the genus Cucurbita. Serolog. Museum Bull. **13**, 5—8 (1954). — Berg, H. vom: Über serologische Organspezifität bei Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **50**, 93—99 (1932). — Boattini, G.: Über die sogenannte Anaphylaxie gegenüber Lipoiden. Z. Immun. forsch. **64**, 320 (1929). — Boom, B. K.: Botanisch-serologische Onderzoekingen. Diss. Wageningen 1930. — Boyden, A. A.: Systematic serology: a critical appreciation. Physiologic. Zool. **15**, 109—145 (1942). — The measurement and significance of serological correspondence among proteins. Serolog. Museum Bull. **12** 6 (1954). — Boyden, A. A., and D. Gemeroy: The relative position of Cetacea among the orders of Mammalia as indicated by precipitin tests. Zoologica (N. Y.) **35**, 145—151 (1950). — Boyden, A. A., D. Gemeroy and R. de Falco: Parallelism in serological correspondence. Serolog. Museum Bull. **6**, 6—7 (1951). — Chester, K. St.: A critique of plantserology. Quart. Rev. Biol. **12**, 19—46, 165—190, 294—321 (1937)a. — Anaphylaxis tests for differentiating the proteins of normal Solanaceae. Amer. J. Bot. **24**, 451—54 (1937b). — Cohen, E.: A comparison of the total protein and albumin content of the blood sera of some reptiles. Science (Lancaster, Pa.) **119**, 98—99 (1953). — A serological study of whole and fractionated sera of some reptiles and amphibians. Serolog. Museum Bull. **12**, 6—7 (1954). — Dale, H.: The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. J. of Pharmacol. **4**, 167 (1913). — Dale, H., u. P. Hartley: Anaphylaxis to the separated proteins of horse serum. Biochem. Z. **10**, 408 (1916). — Dessy, G.:

Boll. Ist. sieroter. milan. **7**, 599 (1928). — Doerr, R.: Die Anaphylaxie, Bd. 1, 1950. Die Anaphylaxie, Bd. 2, 1951. Aus: Die Immunitätsforschung. Wien: Springer 1947—1952. — Doerr, R., u. W. Berger: Über die Verhältnisse der Fraktionsspezifität zur Artspezifität bei den Eiweißkörpern der Blutsera. Z. Immun.forsch. **96**, 258 (1922). — Gell, P. H. G., C. R. Harrington and R. P. Rivers: The antigenic function of simple chemical compounds: Production of precipitins in rabbits. Brit. J. exper. Path. **27**, 267—286 (1946). — Gohlke, K.: Die Brauchbarkeit der Serumdiagnostik für den Nachweis zweifelhafter Verwandtschaftsverhältnisse im Pflanzenreiche. Stuttgart u. Berlin: Fr. Grub 1913. 190 S. — Gonzalez, P., M. Armangué et T. Morato: Les lipoides et l'anaphylaxie. C. r. Soc. Biol. Paris **110** (1932). — Gonzalez, P., M. Armangué and Sara Romero: Die Rolle der Lipoide im Forsmanantigen. Amer. J. Hyg. **17**, 277 (1933). — Hammond, H. D.: Systematic serological studies in Ranunculaceae. Serolog. Museum Bull. **14** (1955). — Johnson, M. A.: The precipitin reaction as an index of relationship in the Magnoliaceae. Serolog. Museum Bull. **13**, 1—5 (1954). — Kafka, V.: Taschenbuch der praktischen Untersuchungsmethoden der Körperflüssigkeiten. Berlin: Springer 1927. — Karush, F.: The interaction of optically isomeric dyes with human serum albumin. J. Amer. Chem. Soc. **76**, 5536 (1954). — Klopstock, A., u. G. E. Selter: Über chemospezifische Antigene. I. u. II. Z. Immun.forsch. **55** (1928). — Krohn, V.: Eine serodiagnostische Nachprüfung der Sympetalen des Königsberger Stammbaumes. Ann. bot. Soc. zool.-bot. fenn. „Vanamo" **4**, 42 (1933). — Bot. Archiv **37**, 328—372 (1935). — Landsteiner, K., and A. A. Di Somma: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. VIII. J. of exper. Med. **72**, 361—366 (1940). — Lange, L.: Serodiagnostische Untersuchungen über die Verwandtschaften innerhalb der Pflanzengruppe der Ranales. Bot. Archiv **5**, 413—434 (1924). — Lebedjewa, N. N., u. L. B. Lewinson: Über die Anaphylaxie gegenüber Lipoiden. Zbl. Bakter. I Orig. **117** (1930). — Mez, C., u. H. Ziegenspeck: Der Königsberger serodiagnostische Stammbaum. Bot. Archiv **13**, 483—485 (1926). — Moritz, O.: Zur Kritik der Phytoserologie. Biol. Zbl. **48**, 431—443 (1928). — Weitere Beiträge zur Kritik und zum Ausbau phytoserologischer Methodik. Planta (Berl.) **7**, 759—814 (1929). — Die serologische Analyse von Proteinkomplexen (Protenomen) als Methode der biologischen Verwandtschaftsforschung. Ber. dtsch. bot. Ges. **49** (76)—(78) (1931). — Prinzipien und Beispiele der Anwendung phytoserologischer Methodik. Planta (Berl.) **15**, 647—696 (1932). — Serologische Untersuchungen an Getreidebastarden. Ber. dtsch. bot. Ges. **51** (52)—(57) (1933). — Die botanische Serologie. Beitr. Biol. Pflanz. **22**, 51—90 (1934). — Über serologische Verwandtschaftsforschung. Züchter **6**, 217—221 (1934). — Bericht über Arbeiten zur serologischen Verwandtschaftsforschung. Kiel. Bl. **1942**. — Moritz, O., u. H. vom Berg: Serologische Studien über das Linswickenproblem. Biol. Zbl. **51**, 290—307 (1931). — Moritz, O., u. H. L. Rohn: Zur Frage der serologischen Differenzierbarkeit von Rassen. Cytologia (Fujii-Jubiläumsbd.) **1937**, 948—960. — Otto, R., u. H. Moffmann: Über die Wirkung von Serumlipoiden im Anaphylaxieversuch bei Meerschweinchen. Z. Immun.forsch. **71**, 233 (1931). — Preuss, A.: Serodiagnostische Untersuchungen über die Verwandtschaft innerhalb der Pflanzengruppe der Parietales. Cohn's Beitr. Biol. Pflanz. **13**, 459 (1917). — Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie, 2. Aufl. Darmstadt 1950—1955. — Schultz, W. H.: Physiological studies in anaphylaxis. I.—II. J. of Pharmacol. **1**, 549—567 (1909/10); **2**, 221—229 (1910/11). — Went, St., u. K. Lissak: Über die Rolle der Serumlipoide. II. Mitt. Serolog. Beitr. Z. Immun.-forsch. **82**, 474 (1934). — Zade, A.: Die Verwendbarkeit der Präzipitinreaktion in der Samenprüfung. Frühlings landw. Z. **61**, 807—810 (1912).

Dr. O. Moritz, Kiel, Inst. f. Pharmakognosie

Planta, Bd. 47, S. 47—52 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

# ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER STOFFAUFNAHME DURCH BLATTEPIDERMEN UND DER ZAHL DER PLASMODESMEN IN DEN AUSSENWÄNDEN*

Von

WALTER SCHUMACHER und PETER LAMBERTZ

*(Eingegangen am 7. Januar 1956)*

Nachdem der Nachweis gelungen war, daß die plasmodesmenartigen Strukturen in den Epidermisaußenwänden vieler Pflanzen offenbar sehr labile Gebilde darstellen, die in einem tagesperiodischen Wechsel (Maximum in den Nachtstunden) auftreten und wieder verschwinden und auch sonst auf allerlei Außenfaktoren reagieren (L., Planta 44, 1954), lag es nahe, auch den Einfluß stofflicher Reize in den Kreis der Untersuchungen einzubeziehen. Da heute kaum mehr daran gezweifelt werden kann, daß die verschiedensten Stoffe (Zucker, anorganische Salze, Wuchsstoffe, Spritzmittel, Insektizide usw.) durch die Epidermen der Blätter aufgenommen werden können, interessierte besonders die Frage, ob bei solchen Vorgängen vielleicht auch Veränderungen in der Zahl oder Gestalt unserer Außenwandplasmodesmen beobachtet und somit Beziehungen zwischen der Stoff- bzw. Reizaufnahme und dem Auftreten der Außenwandplasmodesmen erkannt werden könnten.

Wir berichten im folgenden kurz über Versuche, die zwar noch in mannigfaltiger Richtung des weiteren Ausbaus bedürfen, die es aber doch bereits gestatten, die aufgeworfenen Fragen zu beantworten.

Wir haben auf eng begrenzte Stellen der Blattoberseite unserer Versuchspflanzen (Primeln, Passifloren u. a.) mittels getränkter Wattebäusche Lösungen der zu untersuchenden Stoffe oder Stoffgemische aufgebracht. Die Blätter blieben während des Versuches an der Pflanze und wurden höchstens durch übergestülpte Deckel kleiner Petrischalen an den behandelten Stellen vor dem Eindunsten der Lösung geschützt.

* Obwohl wir nach wie vor der Meinung zuneigen, daß unsere Strukturen in den Epidermisaußenwänden den Innen-Plasmodesmen, welche die Protoplasten zweier benachbarter Zellen verbinden, wesensgleich sind, mag es zweckmäßig sein, einen kurzen eigenen Namen zu verwenden. Wir folgen einer Anregung von Herrn Prof. RUHLAND, wenn wir für unsere Strukturen in den Außenwandungen den Namen „Ektodesmen" in Vorschlag bringen. Sinngemäß müßte dieser Name auch auf die Gebilde in den Wänden der im Wirtsgewebe wuchernden hyphenartigen Zellen von *Cuscuta* Anwendung finden, wo sie von SCHUMACHER u. HALBSGUTH zuerst entdeckt worden sind (1939).

Nach einigen Stunden wurden die Wattebäusche entfernt, die unter ihnen gelegenen Blatteile herausgeschnitten, fixiert und auf das Auftreten von Plasmodesmen geprüft. Zur Kontrolle wurde an demselben Blatt, meist an entsprechender Stelle der anderen Blatthälfte, eine unbehandelte Blattpartie untersucht.

Teilweise haben wir diese Kontrollstücke auch Blatteilen entnommen, denen ein mit destilliertem Wasser getränkter Wattebausch aufgelegen hatte. Einen Unterschied gegenüber den völlig unberührten Luftkontrollen haben wir nicht bemerkt. Wesentlich ist, daß die zum Versuch herangezogenen Blätter vorher sorgfältig ausgewählt werden und daß nicht Blatteile miteinander verglichen werden, die schon in der Farbe erkennbare Unterschiede aufweisen. Wird hierauf geachtet, dann haben wir innerhalb eines einzelnen Blattes weder zwischen den vergleichbaren Blatthälften noch zwischen Spitze und Basis des Blattes in Form oder Zahl der Außenwandplasmodesmen größere Unterschiede gefunden. Anfänglich haben wir auch Gelatinetropfen benutzt, in denen die zu prüfenden Stoffe gelöst waren. Wir ziehen jedoch das Aufbringen wäßriger Lösungen in Watte bei der kurzen Versuchsdauer vor.

Fixierung und Darstellung der Außenwandplasmodesmen erfolgte nach dem von dem einen von uns vor kurzem genauer beschriebenen Verfahren (L., 1954). Von beiden Proben eines Versuches wurde jeweils eine größere Anzahl von Querschnitten (50—80) unter dem Mikroskop durchmustert und die Zahl der Außenwandplasmodesmen auf folgende Weise festgehalten. Es bedeuten in unseren weiteren Ausführungen:

++++ = In fast allen Zellen des Schnittes sehr viele Außenwandplasmodesmen.
+++ = In vielen Zellen zahlreiche Außenwandplasmodesmen.
++ = In vielen Zellen wenige Außenwandplasmodesmen.
\+ = Nur in wenigen Zellen spärliche Außenwandplasmodesmen.
— = Keine Außenwandplasmodesmen.

Die zusätzlich angeführten Zahlen geben die Anzahl der geprüften Schnitte wieder. Es bedeutet z. B. ++++ 50/10: Von insgesamt 60 Schnitten hatten 50 das Prädikat ++++, während 10 in die niedrigeren Kategorien +++ bis — eingereiht wurden. Auf diese Weise haben wir versucht, den im übrigen kaum täuschenden subjektiven Gesamteindruck etwas quantitativ zu unterlegen, da eine wirklich exakte Auszählung der im allgemeinen sehr großen Zahl von Plasmodesmen kaum durchführbar erscheint. Wir haben Querschnitte den zunächst einfacher erscheinenden Flächenschnitten vorgezogen, da nur bei ihnen absolute Sicherheit vor eventuellen Täuschungen durch aufliegende Körnchen und Fällungen besteht, und zugleich ein Urteil darüber gewonnen werden kann, wieweit die Plasmodesmen die ganze Wand durchsetzen.

Natürlich muß man sich darüber klar sein, daß der Versuch, durch künstliche Stoffzufuhr von außen die Zahl der Außenwandplasmodesmen zu beeinflussen, in das natürliche, ohnehin bestehende und von anderen Faktoren gesteuerte Wechselspiel des Erscheinens und Wiederverschwindens unserer Strukturen irgendwie eingreifen und sich dagegen zur Geltung bringen muß, wenn ein Erfolg erkannt werden soll. Da wir bisher in erster Linie die Tagesrhythmik als beherrschenden Faktor kennen, haben wir unsere Versuche in der Regel so angestellt, daß wir die zu prüfenden Stoffe während und gegen Ende des natürlichen tages-

periodischen Minimums (Mittag bis Spätnachmittag) einwirken ließen und danach untersuchten, ob eine zeitlich beschleunigte Vermehrung der Zahl eingetreten war. In den Stunden, in denen das natürliche tagesperiodische Minimum bzw. Maximum bereits erreicht ist, scheint nach unseren bisherigen Erfahrungen eine weitere Verminderung bzw. Vermehrung schwierig zu sein. Wohl aber vollzieht sich der Übergang zur anderen Phase unter unserem Eingriff oft um mehrere Stunden (4—5) beschleunigt oder verzögert, wenn der Zeitpunkt richtig gewählt wird. Da die normalen Maxima und Minima nicht unbedingt zeitlich festliegen, sondern ihrerseits wieder durch allerlei andere Einflüsse gestört bzw. verschoben werden können, leuchtet es ein, daß man mit einer ziemlichen Streuung der Ergebnisse rechnen muß.

Im folgenden mag aus 58 gleichartigen Versuchen eine Reihe von Versuchen herausgegriffen werden, bei denen gleichzeitig auf 6 Blätter einer einzigen im Gewächshaus wachsenden Pflanze von *Passiflora quadrangularis* fünf Stunden lang Tropfen einer Lösung aufgesetzt waren, die folgende Zusammensetzung hatte: Glukose 0,1 g, $NH_4NO_3$ 0,1 g, Glykokoll 0,01 g, Glutaminsäure 0,01 g, Glukosamin 0,01 g, Ascorbinsäure 0,05 g, Coffein 0,01 g, Aqua dest. 100 $cm^3$, $p_H$ durch Zusatz von etwas $NH_3$ = 6,5.

Versuch 31. 19. 10. 55, *Passiflora quadrangularis*, 13—18 h, kühl, sonnig, $t = 20^0$ C. Gewächshaus. (Natürl. Minimum 10—14 h, Max. 23—3 h.)

| | *Versuchslösung* | *Luftkontrolle* |
|---|---|---|
| 1. Blatt | ++++ 50/3 | +++ 5/49 |
| 2. Blatt | ++++ 54/6 | +++ 7/51 |
| 3. Blatt | +++ 40/11 | ++ 12/41 |
| 4. Blatt | ++++ 60/3 | +++ 25/41 |
| 5. Blatt | ++++ 61/5 | ++++ 10/43 |
| 6. Blatt | +++ 61/14 | ++ 19/33 |

Wie man sieht, ist die Zahl der Außenwandplasmodesmen an den Stellen, die mit der Versuchslösung in Berührung gestanden hatten, fast überall deutlich gegenüber den Kontrollen erhöht. Es ist also zweifellos möglich, in das merkwürdige Wechselspiel des Auftretens und Wiederverschwindens unserer Strukturen von außen her einzugreifen und hiermit einen neuen Beweis für die Vitalität der ganzen Erscheinung zu führen.

Der Umstand, daß wir in diesen Versuchen gleichzeitig ein Gemisch verschiedener gelöster Substanzen und nicht die isolierten einzelnen Stoffe verwendet haben, erklärt sich daraus, daß wir anfänglich noch eine weitere Absicht verfolgten. Da unsere früheren Erfahrungen gelehrt hatten, daß zur guten Darstellung der Außenwandplasmodesmen im Fixiergemisch freie $Hg^{++}$-Ionen vorhanden sein müssen, die an unseren Wandstrukturen irgendwie gebunden und reduziert werden, lag der Gedanke nahe, besonders solche Stoffe zur Anwendung zu bringen, welche die Reduktionskraft des Plasmas verstärken und so vielleicht nicht nur Quecksilber-

salze, sondern auch andere Metallverbindungen zur Reduktion bringen könnten. Tatsächlich gelang es bei den Blättern von *Cyclamen europaeum*, auf die 4—12 Stunden lang Wattebäusche mit einer Lösung von 0,05 g l-Ascorbinsäure und 0,01 g Glykokoll in 100 cm³ Wasser aufgebracht worden waren, zahlreiche, sehr feine Außenwandplasmodesmen zur Darstellung zu bringen, wenn die Blattstücke nach Abbruch des Versuches etwa 6 Stunden lang im Licht in eine 1%ige ammoniakalische Silbernitratlösung eingetaucht und nach anschließendem gründlichem Wässern auf dem Gefriermikrotom in üblicher Weise geschnitten wurden. Bei anderen Pflanzen versagte leider bisher dieses neue Darstellungsverfahren, das etwa der von PFEIFFER-WELLHEIM zum Nachweis der Innenplasmodesmen benutzten, aber dort ebenfalls nur beschränkt verwendbaren Methodik entspricht. Der eine von uns (SCH.) hatte schon früher ein einziges Mal bei Ranken von Passifloren damit auch in der Außenwand einen nicht wieder zu reproduzierenden Erfolg.

Unter den in unserem Gemisch vorhandenen Stoffen scheinen, wie besondere mit den einzelnen Substanzen isoliert durchgeführte Versuche zeigten, in erster Linie die *Aminosäuren* und Amide eine positive Wirkung zu haben. Auch Zucker wirkt, für sich allein gegeben, fördernd, desgleichen Coffein, während Ammoniumnitrat bisher in unseren Versuchen keine Wirkung erkennen ließ. Allerdings haben wir das Salz in wesentlich geringerer Konzentration angewendet als MOTHES bei seinen Fütterungsversuchen. Auch eine vollständige anorganische Nährlösung (VON DER CRONE) blieb bisher ohne erkennbaren Erfolg.

Unter den geprüften Aminosäuren verdient das *Histidin* besonderes Interesse. Wird diese Aminosäure allein oder zusätzlich zu unserem Gemisch in der Menge von 0,01 g/100 cm³, in der auch die anderen Aminosäuren positiv wirken, einem Blatt geboten, so ist nach Abbruch des Versuches die Zahl der Außenwandplasmodesmen an der applizierten Stelle nicht höher, sondern deutlich niedriger als bei der Kontrolle, d. h. es wird keine Förderung, sondern eine Hemmung in der Darstellungsmöglichkeit unserer Plasmodesmen beobachtet.

*Versuch 13.* 7. 9. 55. *Primula denticulata*, drei Pflanzen im Freiland. Bedeckt, $t = 19—14{,}6^0$ C. (Natürl. tagesperiodisches Minimum ca. 9—15 h, Maximum 20—24 h.) Von 9—17 h vollständige Versuchslösung wie in Versuch 31, zusätzlich mit 0,01 g *Histidin*/100 cm³.

| *Versuchslösung* | | *Wasserkontrolle* |
|---|---|---|
| 1. Pflanze | + 5/50 | ++ 28/40 |
| 2. Pflanze | ± 2/65 | ++ 12/52 |
| 3. Pflanze | +++ 20/43 | ++++ 50/10 |

Wird dagegen das Histidin nur in einer 1000fach geringeren Konzentration geboten (0,00001 g/100 cm³), wie sie z. B. von FITTING bei seinen Chemodineseversuchen bei *Vallisneria*-Blättern verwendet wurde, dann erhält man einen deutlich positiven Effekt.

*Versuch 25.* 25. 10. 55. *Primula denticulata*, Freiland. Bedeckt, $t = 12—11^0$ C, von 12—18 h reine Histidinlösung in Wasser (0,00001 g je 100 cm³, $p_H = 6$).

| | *Versuchslösung* | *Kontrolle* |
|---|---|---|
| 1. Pflanze | +++ 40/30 | ++ 30/32 |
| 2. Pflanze | ++++ 55/20 | ++ 35/30 |
| 3. Pflanze | +++ 35/20 | ++ 12/49 |

Auch der Zusatz von Histidin zur vollständigen Versuchslösung ergibt in dieser geringen Konzentration dasselbe Resultat wie die reine Lösung.

Gerade diese Versuche mit der verschiedenen Wirkung des Histidins bei wechselnden Konzentrationen legen den Gedanken nahe, daß es weniger die Nährwirkung, als vielmehr eine Reizwirkung der angewendeten Substanzen ist, die das eigentümliche Wechselspiel der Plasmodesmen beherrscht.

Soweit unsere Beobachtungen bisher reichen, tritt der Wechsel in der Zahl der Plasmodesmen ziemlich rasch, etwa im Verlauf von $^1/_2$ bis 1 Stunde auf. Es müßte daher möglich sein, bei einer genügenden Anzahl von Versuchen den Zeitpunkt noch weiter einzugrenzen und das Erscheinen bzw. Verschwinden der Strukturen direkt zu beobachten. Wir haben bisher der Annahme zugeneigt, daß dem Wechsel in der Darstellungsmöglichkeit ein wirklicher Wechsel in dem Vorhandensein der ganzen Plasmodesmen zugrunde liegt. Es wäre jedoch auch denkbar, daß ein „Aktivitätswechsel" der die Quecksilberreduktion bedingenden Faktoren im Plasma das Auftreten bzw. Verschwinden unserer Strukturen nur vortäuscht. Wir glauben, bereits mehrere Male zur Zeit des verstärkten Auftretens eine vermehrte Anzahl von Plasmodesmen gesehen zu haben, die vom inneren Plasmawandbelag her nur etwa die halbe Wandbreite durchsetzten und nicht (noch nicht?) nach außen durchgingen. Dies dürfte für ein tatsächliches erneutes „Wiedereinwachsen" in die Wand sprechen. Genauere, nunmehr mögliche Untersuchungen müssen hier endgültige Klarheit schaffen.

## Zusammenfassung

Es gelingt, durch Auftragen von Lösungstropfen auf lokal begrenzte Stellen der Blattoberfläche verschiedener Pflanzen die Zahl der Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden („Ektodesmen") zu vermehren oder zu vermindern. Besonders Aminosäuren lösen in schwächeren Konzentrationen eine Vermehrung aus, auch Zucker und Coffein haben positive Wirkung, während anorganische Salze bisher keinen Erfolg erkennen ließen. Histidin wirkt nur in sehr starker Verdünnung fördernd, während Konzentrationen von 0,01% bereits die Plasmodesmen zum Verschwinden bringen. Diese Versuche stellen somit weitere Beweise für die Vitalität der ganzen Erscheinungen dar, die wahrscheinlich als Reizvorgänge gedeutet werden müssen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung.

## Literatur

Fitting, H.: Untersuchungen über Chemodinese bei Vallisneria. Jb. wiss. Bot. **67**, 427—593 (1928). — Über die Auslösung von Protoplasmaströmung durch optisch aktive Aminosäuren. Jb. wiss. Bot. **70**, 1—25 (1929). — Lambertz, P.: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. Planta (Berl.) **44**, 147—190 (1954). — Mothes, K., u. G. Trefftz: Die Stickstoffernährung der Pflanzen über die Blätter und ihre Bedeutung für die Alkaloidsynthese. Naturwiss. **41**, 382—383 (1954). — Pfeiffer-Wellheim, F.: Über ein Silberimprägnierungsverfahren zur Darstellung der Plasmodesmen in einigen Endospermzellen und bei Moosblättern. Z. wiss. Mikrosk. **41** (1924). — Schumacher, W., u. W. Halbsguth: Über den Anschluß einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Jb. wiss. Bot. **87**, 324—355 (1939).

Prof. Dr. W. Schumacher, Botanisches Institut der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 170

Planta, Bd. 47, S. 53—80 (1956)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen

# DIE VERTEILUNG DER FREIEN AMINOSÄUREN IN DER PFLANZE UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH PHOTOPERIODISCHE INDUKTION (UNTERSUCHUNGEN AN KALANCHOË BLOSSFELDIANA) *

Von

CHAMAN LAL MADAN **

Mit 17 Textabbildungen

*(Eingegangen am 8. Dezember 1955)*

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit vergleichenden Untersuchungen über die quantitative Zusammensetzung der freien Aminosäuren verschiedener Pflanzenorgane. Insbesondere interessieren dabei die *Differenzen zwischen Sproß und Wurzel* sowie *Veränderungen der Aminosäuren im Zusammenhang mit dem Übergang der Pflanze zur Blütenbildung*.

Das Studium biochemischer Prozesse während der Determination des Vegetationspunktes zur Blütenknospe ist nur möglich an Versuchspflanzen, die sich unter einwandfrei reproduzierbaren Bedingungen in ihre reproduktive Entwicklungsphase überführen lassen. Für die Bearbeitung des Aminosäurestoffwechsels erschien die in ihrem physiologischen Verhalten gut bekannte Kurztag-Crassulacee *Kalanchoë Blossfeldiana* besonders geeignet (HARDER und v. WITSCH 1940, HARDER 1946, 1948 u. a.), da über deren Eiweißstoffwechsel bereits erste Untersuchungen vorliegen (METZNER 1954a, b, 1955).

Über die *Beeinflussung des N-Stoffwechsels durch photoperiodische Induktion* ist schon mehrfach gearbeitet worden. So finden sich u. a. bei MURNEEK (1937) sowie PARKER und BORTHWICK (1939) Angaben über Mengenunterschiede der löslichen N-Verbindungen zwischen vegetativen und induzierten Pflanzen. Daß von diesen Änderungen auch Aminosäuren betroffen sind, konnten SIRCAR und DE (1948) sowie METZNER (1954b) nachweisen. Wir wissen aber noch nicht, inwieweit diese Mengenänderungen alle Komponenten der Gesamtfraktion gleichmäßig erfassen; es ist möglich, daß nur einzelne Aminosäuren in ihrer Konzentration beeinflußt werden.

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

** Stipendiat des Indo-German Industrial Cooperation Scheme und der J. N. Tata Endowment, Bombay.

Die analytische Erfassung der quantitativen Zusammensetzung der freien Aminosäuren einzelner Pflanzenteile ist erst durch die Entwicklung geeigneter Mikromethoden möglich geworden, insbesondere durch die auch für Serienanalysen verwendbare Papierchromatographie. Gerade den Aminosäuren ist ein ganz besonderes Interesse gewidmet worden, zumal deren Fraktionierung die geringsten methodischen Schwierigkeiten bereitet und darüber hinaus eine Reihe sehr empfindlicher Nachweisreagentien zur Verfügung steht. Obwohl die chromatographischen Methoden rasch Eingang in die physiologische Forschung fanden, liegen vergleichende Untersuchungen über die verschiedenen Pflanzenorgane erst sehr vereinzelt vor (VIRTANEN und MIETTINEN 1952, MCCOY, SUBLETT und DOBBS 1953). Über Verschiebungen der Mengenverhältnisse einzelner Zellinhaltsstoffe im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen ist in der pflanzenphysiologischen Literatur bisher nichts bekannt (vgl. aber KUTSKY, EAKIN, BERG und KAVANAN 1953).

## A. Methodik

*1. Pflanzenmaterial.* Sämtliche Versuche wurden an der Kurztag-*Crassulacee Kalanchoë Blossfeldiana* durchgeführt. Die Pflanzen wurden in Töpfen mit Standarderde im Gewächshaus herangezogen und während der Versuche unter möglichst konstanten Bedingungen gehalten. Die Temperatur lag tagsüber bei 18° C; nachts fiel sie auf 15—16° C. Solange die natürliche Tageslänge unterhalb der kritischen Tageslänge ($12^1/_2$ Std., vgl. HAUSCHILD 1943, HARDER und GÜMMER 1947) blieb, wurde um Mitternacht für zwei Stunden Störlicht eingeschaltet (vgl. HARDER und BODE 1943).

Die Hauptversuche wurden im März und Juni 1955 durchgeführt. Die Pflanzen waren um diese Zeit 9 bzw. 12 Monate alt (Juni-Aussaat des Vorjahres) und hatten (einschließlich der makroskopisch erkennbaren Blattanlagen) 13—18 Blattpaare.

Zur Induktion wurden die Pflanzen in eine verdunkelbare Gewächshausabteilung gebracht, in der sie einem Beleuchtungsrhythmus von 9:15[1] Stunden ausgesetzt wurden. Dieser Rhythmus bewirkt bei *Kalanchoë* eine optimale Induktion (HAUSCHILD 1943). Die Kontrollpflanzen wurden im Juni im natürlichen Licht-Dunkel-Wechsel (> 16 Std. Tageslicht) belassen. Im März gelangten sie in einen 13:11-Stunden-Rhythmus. Eine derartige Behandlung der Vergleichsexemplare erschien günstiger als eine Aufhebung der zu langen Dunkelzeit durch eingeschobenes Störlicht[2].

Etwa 2 Stunden nach Lichtbeginn wurden von je 10 Pflanzen die Blätter dreier verschiedener Regionen getrennt geerntet. Im folgenden werden als „alte Blätter" diejenigen des 2. und 3. Wirtels (von unten gerechnet), als „mittlere Blätter" die des 7. und 8. Wirtels und als „junge Blätter" (= „Spitzenregion") die Vegetationskegel mit den obersten 4—5 makroskopisch erkennbaren Blattpaaren bezeichnet. Bei dieser Einteilung stammen die „mittleren Blätter" aus der Zone maximaler photoperiodischer Empfindlichkeit, während die „jungen Blätter" noch kaum reizbar sein dürften. Die „alten Blätter" sind sicherlich weit weniger sensibel als die Blätter der mittleren Sproßregion.

[1] Dunkelzeit unterstrichen.

[2] Störlicht unterbricht die nächtliche Säurebildung (GREGORY, SPEAR und THIMANN 1954); dies kann nicht ohne Einfluß auf enzymatische Prozesse bleiben.

Es wurden stets nur Pflanzen ausgewählt, die keinerlei kranke oder sonstwie geschädigte Blätter aufwiesen. Bei den 12 Monate alten Exemplaren waren die meisten Blätter der untersten Wirtel bereits vergilbt; aus diesem Grunde wurde hier auf die Auswertung der alten Blätter verzichtet.

Die am Wurzelhals abgeschnittenen Wurzeln wurden vorsichtig ausgewaschen. Sie wurden von den anhängenden Erdpartikeln so weit gereinigt, wie dies ohne Abreißen der feineren Seitenwurzeln möglich war. Bei der Kultur der *Kalanchoë* in Standarderde lassen sich leider die letzten Erdreste nicht mehr entfernen. Durch das intensive Auswaschen dürften aber die in diesen Bodenteilchen vorhandenen freien Aminosäuren (Ausscheidungen von Wurzeln und Mikroorganismen der Rhizosphäre) entfernt sein, so daß keine wesentlichen Verfälschungen der Meßresultate zu befürchten sind.

*2. Konservierung des Pflanzenmaterials.* Die frisch geernteten Blätter und Wurzeln wurden sogleich gewogen und anschließend mit einer ausreichenden Menge Trockeneis ($CO_2$-Schnee) eingefroren. Dadurch werden Wurzeln und Blätter glasartig hart, so daß sie im Mörser leicht zerrieben werden konnten. Dieses mit Trockeneisresten vermengte Pulver wurde im Hochvakuum einer zweistufigen Röntgenpumpe (Type 1810 der Firma Pfeiffer, Wetzlar) getrocknet und nach Erreichen der Gewichtskonstanz im Vakuumexsiccator (über $P_2O_5$) aufbewahrt.

Die Konservierung des Untersuchungsmaterials durch Gefriertrocknung setzt das Risiko nachträglicher enzymatischer Veränderungen auf ein Minimum herab. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß sich das äußerst poröse Trockenpulver sehr leicht extrahieren läßt.

*3. Extraktion.* Wäßrige Auszüge aus dem *Kalanchoë*-Trockenpulver enthalten ebenso wie Alkohol- und Acetonextrakte erhebliche Gerbstoffmengen (Ehrenberg 1954, Metzner 1954a, 1955). Es wurde zunächst versucht, diese störenden Begleitstoffe durch Zusatz von Coffein auszufällen (vgl. Metzner 1955). Offenbar reißt aber der Gerbstoff-Alkaloid-Komplex einen Teil der Aminosäuren adsorptiv mit in den Niederschlag. Da auch Versuche, die Extrakte an Austauschersäulen zu reinigen, zu keinen befriedigenden Ergebnissen führten, mußte für die quantitative Auswertung auf die vorherige Abtrennung der Gerbstoffe verzichtet werden. Statt dessen wurde ein Entwicklergemisch gewählt, bei dem die Störungen sich nur in geringem Maße bemerkbar machten (s. unten).

Von allen untersuchten Extraktionsmitteln, u. a. Trichloressigsäure, Methanol, Äthanol und Aceton in verschiedenen Konzentrationen, bewährte sich 70%iges Äthanol am besten (vgl. Dent, Stepka und Steward 1947).

Von den einzelnen Trockenpulvern wurde jeweils 1 g in 10 $cm^3$ 96%igem Äthanol fein zerrieben; nach einigen Minuten wurden weitere 35—40 $cm^3$ 70%iges Äthanol zugesetzt. Nach 6 Stunden wurde der Rückstand abzentrifugiert und noch zweimal mit je 40 $cm^3$ 70%igem Äthanol, schließlich mit 20 $cm^3$ Aqua bidest. ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum (bei 20° C) abgedampft, der Rückstand mit 2 $cm^3$ Aqua bidest. aufgenommen, die Suspension über Nacht (bei 4° C) stehen gelassen und schließlich scharf zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde (mit Aqua bidest.) auf 2 $cm^3$ aufgefüllt.

Den Extrakten wurde zur Konservierung je ein Tropfen Toluol zugesetzt.

*4. Chromatographie.* Alle chromatographischen Trennungen wurden auf dem Papier 2043 b Mgl (Schleicher & Schüll) durchgeführt. Die Originalbogen wurden in vier gleiche Teile (je 28 × 30 cm) zerschnitten, deren jeder in 8 Einzelstreifen unterteilt wurde. Zur Erhöhung des Trenneffektes wurden die Streifen kurz oberhalb der Startstelle mit einer „Taille" versehen (Abb. 1, vgl. Metzner 1955).

Aufgetragen wurden jeweils 10 $mm^3$ Substanzlösung. Diese enthalten die Aminosäuremenge von 5 mg Trockensubstanz. Alle Trennungen wurden aufsteigend

ausgeführt. Als Entwicklungsgemisch bewährte sich vor allem sec. Butanol-Ameisensäure-Wasser 75:13:12 (TURBA 1954). Diese Mischung, in der die durch den Gerbstoff bedingten Störungen geringer als in allen anderen geprüften Phasensystemen waren, wurde innerhalb von 16 Stunden bis zu einer Höhe von 28 cm aufgesaugt. Sobald der der Chromatographiekammer entnommene Bogen lufttrocken war, wurde das gleiche Lösungsmittel noch ein zweites Mal aufsteigen gelassen; dieses erneute Hochsaugen dauerte rund 12 Stunden.

Die somit doppelt entwickelten und (an der Luft) getrockneten Chromatogramme wurden mit einer 0,2%igen Lösung von Ninhydrin in 96%igem Äthanol angesprüht, sodann in einer 90° C warmen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre für 10 Minuten entwickelt. Die Farbintensität der einzelnen Substanzflecken hat nach dieser Zeit ihr Maximum erreicht (vgl. REDFIELD und BARRON 1952, METZNER 1955).

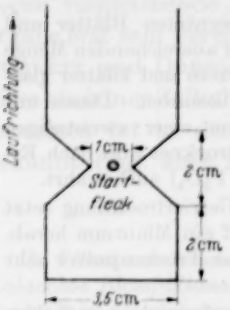

Abb. 1. Form des Chromatographiebogens

Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten reichen eindimensionale Chromatogramme nicht aus. Es wurden daher zusätzlich eine Reihe zweidimensionaler Vergleichschromatogramme angesetzt, die in der ersten Dimension mit dem oben beschriebenen Ameisensäure-Butanol-Gemisch, in der zweiten mit einer Lösung von Phenol in einem Citrat-Phosphat-Puffer (BERRY und CAIN 1949) entwickelt wurden.

*5. Quantitative Auswertung.* Die eindimensionalen Chromatogramme wurden durch unmittelbare Extinktionsmessung der angefärbten Streifen colorimetrisch ausgewertet. Wie bereits erwähnt, ließen sich in einem einzigen Trennungsgang nicht alle Komponenten klar voneinander trennen. So entstehen Banden, die jeweils mehreren Aminosäuren entsprechen. Diese wurden nicht weiter zu fraktionieren versucht, sondern als „Sammelbanden" ausgewertet (vgl. METZNER 1955).

Die Messung der Einzelstreifen erfolgte nach der von METZNER (1955) ausgearbeiteten Vorschrift. An Stelle des Zeißschen Spektralphotometers konnte jedoch der Zeißsche Extinktionsschreiber verwendet werden, so daß eine vollautomatische Registrierung der — insgesamt etwa 200 — Extinktionskurven möglich war[1].

## B. Ergebnisse

### 1. Die Aminosäuren der vegetativen *Kalanchoë*

Abb. 2 gibt eine Gegenüberstellung der Menge freier Aminosäuren für die einzelnen Regionen der vegetativen *Kalanchoë* (Langtag-Exemplare). Bei den wiedergegebenen Zahlenwerten handelt es sich um die Summe der auftretenden Komponenten, ermittelt aus der Integration aller Extinktionskurven der betreffenden Chromatogramme. Selbstverständlich kann eine derartige Mengenangabe nicht die Genauigkeit beanspruchen, die einer speziellen Aminosäurebestimmung zukommen würde, da die Fehler aller Einzelmessungen sich addieren können. Für Vergleichszwecke können diese Daten aber ohne weiteres herangezogen werden.

[1] Der Firma Carl Zeiß (Oberkochen) danke ich für die leihweise Überlassung ihres neuen Extinktionsschreibers.

Demnach enthalten die *Kalanchoë*-Wurzeln eine erhebliche Menge freier Aminosäuren; die Konzentration liegt hier rund doppelt so hoch wie innerhalb der Vegetationskegel. Die geringste Aminosäuremenge weisen die mittleren Blätter auf, also gerade die Zone mit der höchsten photoperiodischen Empfindlichkeit (s. oben), doch unterscheiden sich die einzelnen Laubblattetagen nicht sehr deutlich voneinander.

An Hand der zweidimensionalen Chromatogramme konnten (nach steigendem $R_F$-Wert in der Butanol-Ameisensäure geordnet) folgende Aminosäuren und Amide identifiziert werden: Cystein, Histidin, Lysin, Asparagin, Arginin, Glutamin, Asparaginsäure, Serin, Glykokoll, Glutaminsäure, Threonin, α-Alanin, β-Alanin, γ-Aminobuttersäure, Valin, Phenylalanin und Leucin und/oder Isoleucin. Nicht nachweisbar waren — trotz Anwendung spezieller Nachweismethoden — Methionin, Tyrosin und die beiden Iminosäuren Prolin und Oxyprolin. Dagegen scheint Tryptophan (regelmäßig?) vorzukommen, allerdings in Konzentrationen, die eine Berücksichtigung im Rahmen der quantitativen Auswertungen nicht gestatten. Von diesen Komponenten bilden Cystein-Histidin, Lysin-Asparagin, Arginin-Glutamin, Serin-Glykokoll, Glutaminsäure-Threonin sowie α- und β-Alanin Sammelbanden. Bei den beiden Doppelbanden aus Hexonbasen und Amiden überwiegen die Amidkonzentrationen beträchtlich; bei den Alaninen ist das α-Alanin in wesentlich höherer Konzentration vorhanden (s. unten). Ebenso überwiegt die Glutaminsäuremenge die Menge an Threonin. Im folgenden werden nur Cystein-Histidin und Serin-Glykokoll als Doppelbanden angeführt. Bei allen aus zwei Komponenten zusammengesetzten Banden muß damit gerechnet werden, daß auch die relative Zusammensetzung der Flecken Schwankungen unterworfen ist.

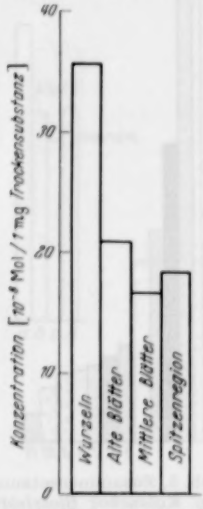


Abb. 2. Konzentration der freien Aminosäuren in verschiedenen Organen von *Kalanchoë Blossfeldiana*

Die Abb. 3 zeigt die Zusammensetzung der Aminosäurefraktion der verschiedenen Pflanzenteile (geordnet nach abnehmender Häufigkeit in der Wurzel). Im folgenden soll besonders das Verhalten der drei „Grundaminosäuren"[1] besprochen werden. Sie stellen in allen Organen mehr als 50% der gesamten Aminosäurefraktion.

In der Wurzel liegt eine sehr erhebliche Menge an Asparaginsäure vor; mit einigem Abstand folgen Glutaminsäure und Alanin, wobei hier

[1] Unter „Grundaminosäuren" sollen hier mit VIRTANEN (1955) die beiden Dicarbonsäuren und das α-Alanin verstanden werden.

dem α-Alanin noch etwas β-Alanin beigemischt ist. Das β-Alanin tritt in den oberirdischen Teilen der *Kalanchoë* sehr zurück; lediglich die ältesten Blätter lassen noch deutliche Mengen erkennen.

Im Gegensatz zur Wurzel stellen wir in allen oberirdischen Teilen vegetativer *Kalanchoë*-Exemplare ein Vorherrschen der Glutaminsäure gegenüber der Asparaginsäure fest. Das α-Alanin ist in den ältesten Blättern die stärkste Fraktion überhaupt. Bis zu den jüngsten Blättern

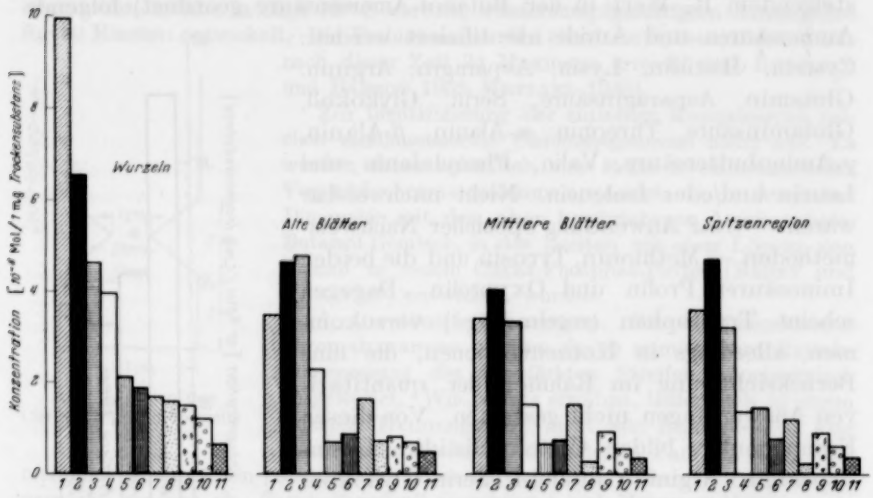


Abb. 3. Zusammensetzung der Fraktion der freien Aminosäuren in verschiedenen Organen von *Kalanchoë Blossfeldiana*. ■ Asparaginsäure, ■ Glutaminsäure-Threonin, ▤ α- und β-Alanin, □ Serin-Glykokoll, ▥ Arginin-Glutamin, ▦ Valin, ■ γ-Aminobuttersäure, ▨ Leucin-Isoleucin, ▩ Cystein-Histidin, ▢ Lysin-Asparagin, ▩ Phenylalanin

sinkt seine Konzentration dann unter die der Glutaminsäure und schließlich auch unter die der Asparaginsäure ab.

Wie die Abb. 4 erkennen läßt, zeigen alle Aminosäuren in ihrer Konzentration einen Abfall von der Wurzel bis zu einem Minimum in den mittleren oder jungen Blättern. Allein beim Cystein-Histidin erkennen wir die Minimalkonzentration in den älteren Blättern; die Differenz gegenüber dem Vegetationskegel liegt aber innerhalb der Fehlergrenze der Methode. Das gleiche gilt für das Alanin-Maximum in den alten Blättern.

Die gegenseitigen Mengenverhältnisse ändern sich aber nicht nur bei den Grundaminosäuren, sondern ebenso bei den durch Transaminierungsreaktionen sekundär entstandenen Komponenten (s. unten), doch kann auf diese Zusammenhänge nicht im einzelnen eingegangen werden.

Jedenfalls läßt allein die Gegenüberstellung der Abb. 3 und 4 erkennen, daß in der quantitativen Zusammensetzung der Aminosäure-

fraktion der einzelnen Organe deutliche Differenzen bestehen. Über deren Zusammenhang mit Unterschieden im Stoffwechsel können wir vorläufig noch keinerlei Aussagen machen.

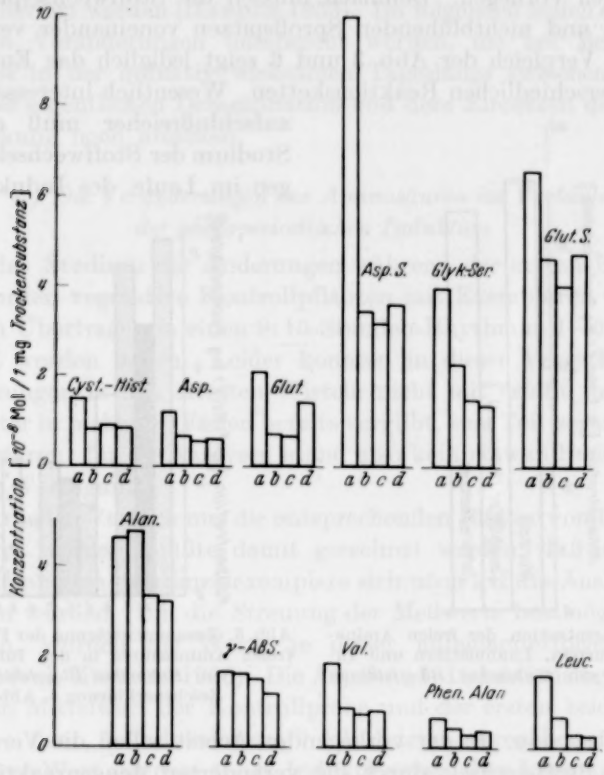


Abb. 4. Konzentration der einzelnen Komponenten der Aminosäurefraktion in verschiedenen Organen von *Kalanchoë Blossfeldiana*. *a* Wurzel, *b* alte Blätter, *c* mittlere Blätter, *d* Spitzenregion

## 2. Die Aminosäuren der *Kalanchoë*-Inflorescenzen

Vergleichsweise wurden auch voll entwickelte Inflorescenzen mit bereits geöffneten Blüten (einschließlich der Brakteen) analysiert. Die Blütenstände weisen einen erheblich höheren Gehalt an freien Aminosäuren auf als die Laubblätter (vgl. Abb. 5). Betrachtet man die quantitative Zusammensetzung innerhalb dieser Region (Abb. 6), so fällt zunächst auf, daß — im Gegensatz zu den oberirdischen Teilen vegetativer Pflanzen (vgl. Abb. 3) — die Asparaginsäure die stärkste Fraktion darstellt. Auch die α-Alanin-Konzentration liegt unverhältnismäßig hoch. Über die anderen Aminosäuren soll hier keine ins einzelne gehende Betrachtung angestellt werden; es sei auf die Abb. 6 verwiesen.

Die Gegenüberstellung der Aminosäurefraktionen von Blüten und Vegetationskegeln nicht induzierter Exemplare läßt erkennen, daß deutliche Unterschiede allein schon im relativen Mengenverhältnis der Grundaminosäuren vorliegen. Demnach müssen die Stoffwechselprozesse in blühenden und nichtblühenden Sproßspitzen voneinander verschieden sein. Der Vergleich der Abb. 3 und 6 zeigt lediglich das Endstadium dieser unterschiedlichen Reaktionsketten. Wesentlich interessanter und aufschlußreicher muß aber das Studium der Stoffwechseländerungen im Laufe des Induktionsvor-

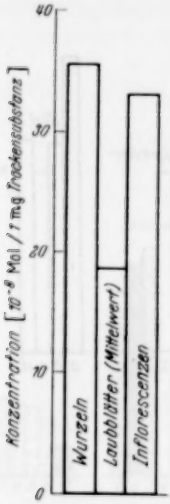


Abb. 5. Konzentration der freien Aminosäuren in Wurzeln, Laubblättern und Inflorescenzen von *Kalanchoë Blossfeldiana*

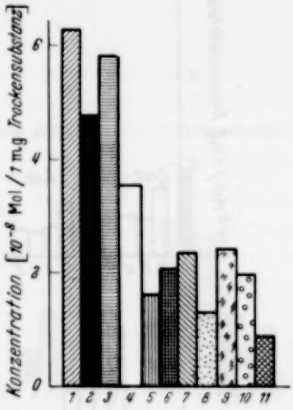


Abb. 6. Zusammensetzung der Fraktion der freien Aminosäuren in den Inflorescenzen von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Zeichenerklärung s. Abb. 3

ganges selbst sein. In der vorliegenden Arbeit sollen die Verschiedenheiten des Stoffwechsels durch die veränderten Mengenreaktionen der Grundaminosäuren charakterisiert werden.

### 3. Veränderungen der Aminosäuren während der photoperiodischen Reaktion

Bei der photoperiodischen Blüteninduktion müssen zwei Phasen unterschieden werden: *Kalanchoë Blossfeldiana* kommt unter unseren Versuchsbedingungen zur Blüte, wenn ihr vier Cyclen optimal wirksamer Tageslänge (9:15 Std., s. oben) geboten werden. Anschließend an diese Behandlung kann die Pflanze wieder in induktiv nicht wirksame Licht-Dunkel-Rhythmen übertragen werden. Es muß demnach nach Ablauf von 4 Tagen bereits der eigentliche Umstimmungsprozeß des Vegetationspunktes erfolgt sein. Aus diesem Grunde soll die Untersuchung der eigentlichen Induktion auch nur bis zum 6. Induktionstag ausgedehnt werden[1].

[1] Durch Mittelwertbildung (s. u.) ist ein Zeitraum von 5 Tagen erfaßt worden.

Für das weitere Differenzierungsgeschehen ist es aber nicht gleichgültig, ob die Pflanzen nach der Schwelleninduktion weiterhin in der induktiven Tageslänge verbleiben oder ob sie unter Langtag-Bedingungen weiterkultiviert werden (HARDER 1953). Im folgenden sollen daher auch diejenigen Veränderungen untersucht werden, die bei Belassen der *Kalanchoë* in der induktiv wirksamen Tageslänge zwischen dem Abschluß der eigentlichen Determination und dem Einsetzen der Inflorescenzstreckung noch ablaufen.

### *a) Die Veränderungen der Aminosäuren im Verlaufe der photoperiodischen Induktion*

Für das Studium der Änderungen während der ersten Induktionsphase wurden vegetative Kontrollpflanzen mit Exemplaren verglichen, die durch Übertragen in einen 9:15-Stunden-Rhythmus 1—6 Tage lang induziert worden waren. Leider konnten in dieser Versuchsreihe die Veränderungen in den ältesten Wirteln nicht mit erfaßt werden, weil ihre Blätter in mehreren Fällen bereits vergilbt, zum Teil sogar schon abgefallen waren; für die Analysen stand also kein einwandfreies Material mehr zur Verfügung.

Da für jeden Versuch nur die entsprechenden Blätter von 10 Pflanzen verarbeitet wurden, mußte damit gerechnet werden, daß individuelle Verschiedenheiten der Einzelexemplare sich noch auf die Analysendaten auswirken würden. Um die Streuung der Meßwerte bestmöglich einzuschränken, wurden die Werte je dreier aufeinanderfolgender Tage gemittelt (vgl. METZNER 1955). Die Angabe „1. Induktionstag" bedeutet daher den Mittelwert der Kontrollprobe und der ersten beiden Induktionstage; der „5. Induktionstag" (als letzter angegebener Wert) ist der mittlere Wert aus dem 4.—6. Induktionstag. Der Langtag-Kontrollwert („0. Induktionstag") hingegen wurde ohne weitere Korrekturen übernommen, da er bereits den Mittelwert der Ergebnisse von sechs unabhängigen Meßreihen vegetativen Materials darstellt.

*α) Veränderungen in der Spitzenregion.* Wie die Abb. 7 erkennen läßt, nimmt die Gesamtmenge der Aminosäuren bis zum 4. Induktionstag ab; sie steigt dann wieder sehr wenig an. Ganz entsprechend fallen von den Grundaminosäuren (s. oben) α-Alanin[1] und Glutaminsäure[1] sogleich deutlich ab; ihre Mengen erreichen am 3. (Glutaminsäure) bzw. 4. (α-Alanin) Induktionstag Minimalwerte. Die Asparaginsäurekonzentration hingegen bleibt im Laufe des 1. Tages unverändert, dann aber fällt sie zu einem Minimum am 3. Tage ab; anschließend läßt sie einen Wiederanstieg erkennen.

[1] Die Mengenangaben beziehen sich auf „Sammelfraktionen" (s. o.). Der Einfachheit halber werden sie in allen denjenigen Fällen, in denen die eine Komponente deutlich überwiegt, wie Einzelkomponenten behandelt.

Die beiden Amide ähneln sich in ihrem Verhalten: Sie werden bis zum Ende des 1. Induktionstages vermehrt; sodann durchlaufen sie ähnliche Wendepunktskurven mit Minima am 3. (Glutamin[1]) bzw. 4. (Asparagin[1]) Tag. Die Mengenveränderungen des Asparagins sind allerdings nur wenig ausgeprägt.

Serin-Glykokoll[1] tritt vom Beginn der Induktion an ständig zurück; die Fraktion Cystein-Histidin[1] läßt vom Ende des 1. Tages an sehr ähn-

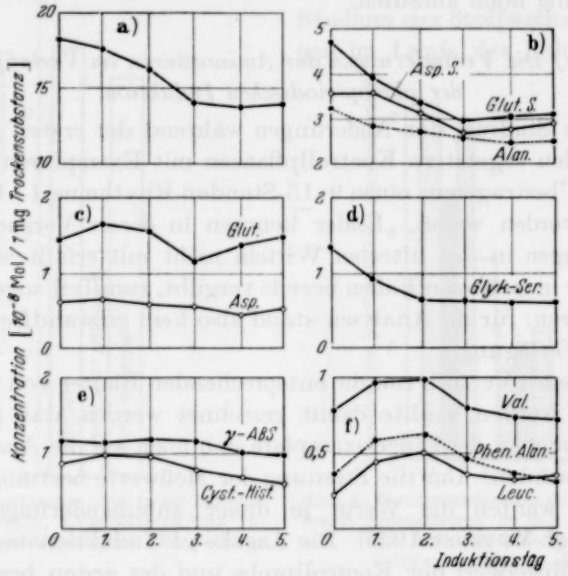


Abb. 7 a—f. Während der photoperiodischen Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in der Spitzenregion von *Kalanchoë Blossfeldiana*

liche Änderungen erkennen, während die Menge der $\gamma$-Aminobuttersäure erst nach dem 3. Tage einen schwachen Rückgang erfährt.

Ein recht übereinstimmendes Bild zeigen die Kurven für Valin, Phenylalanin und Leucin (und/oder Isoleucin)[2]. Alle drei Komponenten nehmen innerhalb der ersten beiden Tage zu; dann fallen sie ab. Lediglich das Leucin steigt nach dem 4. Tage wieder schwach an.

*$\beta$) Veränderungen in den Laubblättern mittleren Alters.* Im Gegensatz zur Spitzenregion, in der zwischen dem 4. und dem 5. Induktionstag ein schwacher Wiederanstieg der Menge freier Aminosäuren zu erkennen ist, fällt die Aminosäurekonzentration bei den mittleren Blättern bis zum

[1] Die Mengenangaben beziehen sich auf „Sammelfraktionen" (s. o.). Der Einfachheit halber werden sie in allen denjenigen Fällen, in denen die eine Komponente deutlich überwiegt, wie Einzelkomponenten behandelt.

[2] Im folgenden einfach als „Leucin" bezeichnet.

Ende der Versuchsreihe (5. Tag) beständig ab (Abb. 8). Das gleiche Bild wie diese Summenkurve zeigen Glutamin- und Asparaginsäure, von denen die Glutaminsäure allerdings eine weitaus stärkere Mengenabnahme erfährt. Das α-Alanin dagegen verhält sich völlig anders: Es durchläuft eine Wendepunktskurve mit einem scharf ausgeprägten Minimum zwischen dem 2. und 3. Tag.

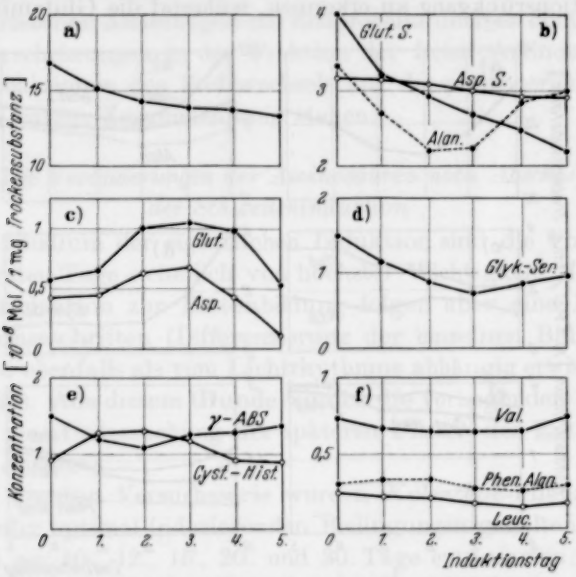


Abb. 8 a—f. Während der photoperiodischen Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in den mittleren Blättern von *Kalanchoë Blossfeldiana*

Ebenso wie in den jüngsten Blättern stimmt auch in dieser Region das Verhalten der beiden Amide wieder gut überein: Nach vorübergehender Konzentrationszunahme bis zum 3. Induktionstag fallen beide unter den Wert der Langtag-Kontrolle.

Das Serin-Glykokoll durchläuft am 3. Induktionstag ein scharfes Minimum. Ähnlich verhält sich die γ-Aminobuttersäure, nur daß diese ihr Minimum bereits am 2. Tage erreicht. Spiegelbildlich dazu verläuft die Mengenänderung bei der Cystein-Histidin-Fraktion, während das Valin in den ersten Induktionstagen ein sehr breites Minimum durchläuft. Der Kurvenverlauf für Phenylalanin und Leucin ist wenig ausgeprägt; beide Komponenten lassen ein Minimum um den 4. Tag herum erkennen.

*γ) Veränderungen in der Wurzel.* Die Gesamtmenge der Aminosäuren fällt innerhalb von 2 Tagen zu einem scharfen Minimum ab, worauf sie dann wieder deutlich ansteigt (Abb. 9). Einen ganz entsprechenden

Kurvenverlauf lassen die drei Grundaminosäuren erkennen. Während aber die beiden Dicarbonsäuren ihren Ausgangswert (Langtag-Kontrolle) nicht wieder erreichen, wird dieser vom Alanin (α-Alanin und β-Alanin, s. oben) schon am 4. Tage überschritten.

Umgekehrt werden die beiden Amide bis zum Ende des 2. Tages vermehrt; beim Asparagin ist dann vom 2. bis zum 3. Tag ein leichter Konzentrationsrückgang zu erkennen, während die Glutaminmenge an-

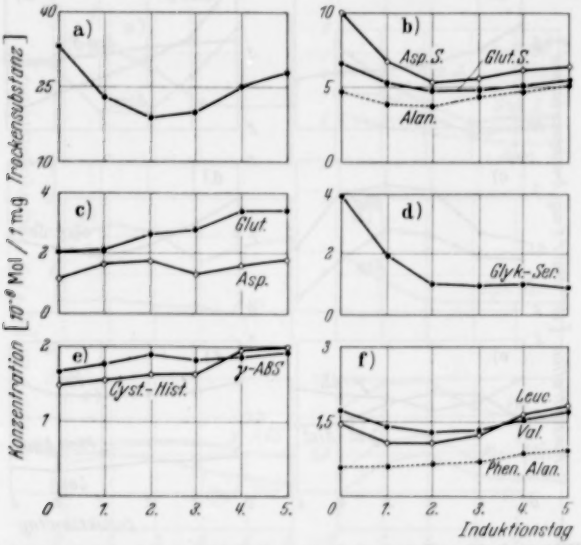


Abb. 9 a—f. Während der photoperiodischen Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in der Wurzel von *Kalanchoë Blossfeldiana*

nähernd konstant bleibt. Nach Ablauf des 3. Induktionstages nimmt dann die Konzentration beider Amide wieder deutlich zu.

Die Kurve für die Serin-Glykokoll-Fraktion fällt in den ersten beiden Tagen kraß ab, hält sich dann aber auf annähernd gleichbleibender Höhe. Cystein-Histidin zeigt eine ständige, allerdings unregelmäßige Zunahme, während sich die γ-Aminobuttersäure ähnlich dem Asparagin verhält. Leucin und Valin ähneln in ihrem Verhalten den drei Grundaminosäuren; beide erreichen zwischen dem 1. und 2. Induktionstag ein Minimum, nach dem sie erheblich wieder ansteigen. Das Phenylalanin läßt sich mit seiner stetigen Konzentrationszunahme mit der Cystein-Histidin-Fraktion vergleichen.

Die in den Abb. 7—9 dargestellten Veränderungen beweisen, daß es schon im Laufe der ersten Induktionstage zu erheblichen Verschiebungen der relativen Mengenverhältnisse innerhalb der Aminosäurefraktion kommt. An diesen Veränderungen mögen Neubildungen ebenso wie

Aminosäureverluste, etwa durch Desaminierungen, beteiligt sein. Wir halten es aber für wahrscheinlicher, daß Umaminierungen eine wesentlichere Rolle spielen.

Vorläufig müssen wir die Veränderungen als experimentell erfaßte Tatsachen hinnehmen; wir sind noch nicht in der Lage, sie in Einzelheiten zu deuten. Wichtig erscheint vor allem die Feststellung, daß sie bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt auftreten. Ähnlich wie die von METZNER (1955) beschriebenen Änderungen der Zellproteine dürften demnach auch die Umbauerscheinungen in der Fraktion der freien Aminosäuren mit den Primärreaktionen des Stoffwechsels auf die photoperiodische Behandlung in engem Zusammenhang stehen.

### *b) Die Veränderungen der Aminosäuren nach Abschluß der Schwelleninduktion*

Für das Studium der eigentlichen Induktion sind die Vorgänge im Laufe der ersten Tage sicherlich von höchster Wichtigkeit. Der eigentlichen Determination zur Blütenbildung folgen aber eine Reihe von Differenzierungsschritten (Differenzierung der einzelnen Blütenteile u. dgl.), die sich ebenfalls als vom Lichtrhythmus abhängig erwiesen haben (EGUCHI 1937). Aus diesem Grunde wurden die vorliegenden Messungen noch durch eine Untersuchung der späteren Phasen des Entwicklungsgeschehens ergänzt.

In einer zweiten Versuchsserie wurden *Kalanchoë*-Pflanzen bis zu 30 Tagen unter optimal induzierenden Bedingungen gehalten. Die Proben wurden am 10., 12., 15., 20. und 30. Tage entnommen; durch die Mittelwertbildung (s. oben) ergibt sich unter Berücksichtigung der Werte der ersten Induktionsphase damit ein Zeitraum vom 7.—22. Induktionstag. Nach Abschluß dieser Untersuchungsreihe standen die Inflorescenzanlagen unmittelbar vor ihrer Streckungsphase.

Die Zusammenfassung von Meßwerten zeitlich relativ weit auseinanderliegender Untersuchungstermine zu einem Mittelwert ist insofern mit einer gewissen Vorsicht zu bewerten, als kurzzeitige Änderungen der Beobachtung entgehen können. Die Analyse größerer Materialmengen, wie sie eine noch häufigere Probeentnahme erfordert hätte, war jedoch allein schon aus apparativen Schwierigkeiten (z. B. Leistungsfähigkeit der Gefriertrocknungsanlage) heraus nicht möglich. Wir sind weiterhin nicht ohne weiteres berechtigt, aus den Meßwerten der 1. (1.—5. Induktionstag) und 2. (7.—22. Induktionstag) Versuchsreihe eine einheitliche Kurve zu konstruieren. Die Ergebnisse wurden ja an Pflanzen verschiedenen physiologischen Alters, noch dazu zu verschiedenen Zeiten, gewonnen. Die Daten lassen sich jedoch recht zwanglos anschließen. Daher wurden auch die Werte der 1. Induktionsphase (Abb. 7—9) vor den Werten aus der 2. Versuchsserie aufgetragen.

*α) Veränderungen in der Spitzenregion.* Die Gesamtmenge der Aminosäurefraktion steigt bis zu einem sehr flachen Maximum am 16. Tage an. Ganz ähnlich verhalten sich von den Grundaminosäuren das α-Alanin und die Glutaminsäure (vgl. Abb. 10): Nach beständigem Konzentrationsanstieg erreichen sie ihr Maximum am 12. bzw. 16. Tag. Die Asparaginsäure andererseits nimmt bis zum Ende der Versuchsserie ständig zu.

Die beiden Amide reagieren durchaus verschieden: das Glutamin tritt mehr und mehr zurück, während das Asparagin seine Konzentration (sehr schwach) erhöht.

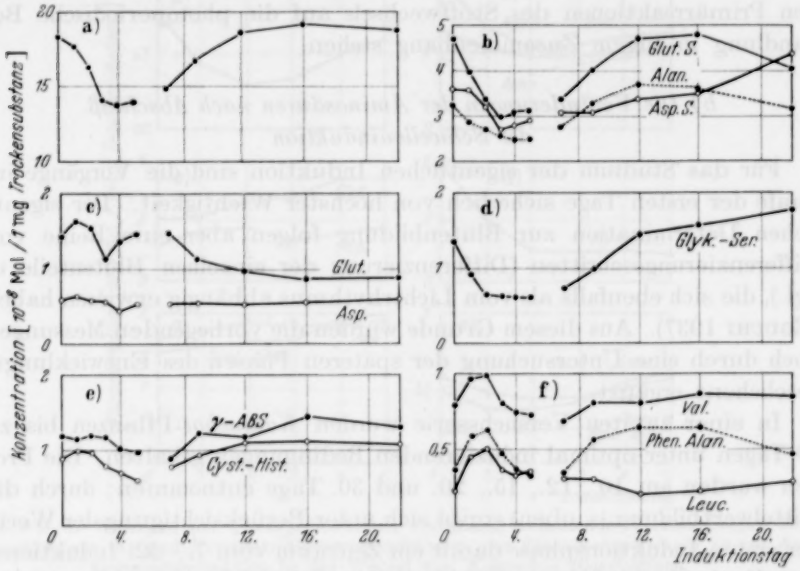


Abb. 10 a—f. In der 1. und 2. Phase photoperiodischer Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in der Spitzenregion von *Kalanchoë Blossfeldiana*

Einen eindeutigen Konzentrationsanstieg hingegen zeigen Serin-Glykokoll und — wenigstens bis zum Ende des 8. Induktionstages — γ-Aminobuttersäure, weniger deutlich außerdem Cystein-Histidin und Valin. Das Leucin durchläuft eine Minimumkurve mit einem Wendepunkt nach 12 Tagen, während die Mengenänderungen des Phenylalanins umgekehrt durch eine Maximumkurve mit Extremwerten zwischen dem 12. und dem 16. Tag wiedergegeben werden.

*β) Veränderungen in den Laubblättern mittleren Alters.* Die Gesamtmenge der freien Aminosäuren steigt bis zum 12. Tage an und fällt dann wieder ab (Abb. 11). Ein übereinstimmendes Maximum (am 12. Tag) zeigen auch Glutaminsäure und α-Alanin; dagegen steigt die Asparaginsäurekonzentration — vom 12. Tage an allerdings nur mehr undeutlich — an.

Die Mengen beider Amide nehmen zu, die des Glutamins jedoch erst nach Ablauf von 9 Tagen.

Die Serin-Glykokoll-Fraktion erreicht nach raschem Anstieg am 16. Tage ein Maximum. Die $\gamma$-Aminobuttersäure zeigt völlig unregelmäßige Schwankungen. Für die übrigen Aminosäuren sind nur geringe Konzentrationsänderungen anzunehmen; dabei durchlaufen Valin und Phenylalanin Wendepunktskurven mit Minima am 16. Induktionstag, während Cystein-Histidin und Leucin undeutlich ansteigen.

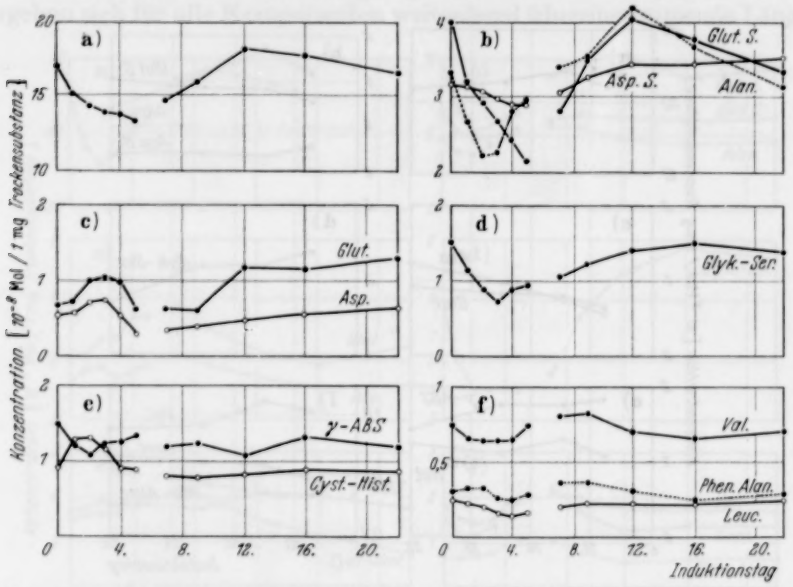


Abb. 11 a—f. In der 1. und 2. Phase photoperiodischer Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in den mittleren Blättern von *Kalanchoë Blossfeldiana*

*$\gamma$) Veränderungen in den alten Laubblättern*[1]. Die Gesamtfraktion verhält sich ganz ähnlich wie in den mittleren Blättern. Dagegen benehmen sich die Grundaminosäuren durchaus verschieden (s. Abb. 12): Die Glutaminsäuremenge nimmt zu, das $\alpha$-Alanin wird bis zu einem Wendepunkt am 12. Tage vermehrt, wohingegen die Asparaginsäurekonzentration annähernd konstant bleibt.

Die Amidkonzentrationen steigen gleichsinnig an, die des Asparagins jedoch deutlicher.

Serin-Glykokoll und $\gamma$-Aminobuttersäure zeigen eine unregelmäßige Konzentrationsabnahme. Die Mengen der übrigen Komponenten (Cystein-Histidin, Valin, Leucin und Phenylalanin) nehmen bis zum 12. Induktionstag zu. Diesen Anstieg setzt das Leucin fort. Die drei anderen

[1] Werte der 1. Induktionsphase fehlen (s. o.).

Aminosäuren treten bis zum 16. (Cystein-Histidin und Phenylalanin) bzw. bis zum 22. (Valin) Tag zurück.

*δ) Veränderungen in der Wurzel.* Die Aminosäuren (Gesamtfraktion) setzen ihre schon während der ersten Induktionsphase begonnene Mengenzunahme nur mehr für wenige Tage fort. Sodann fällt (bis zum 16. Tag) die Konzentration stark ab. Später ist eine klare Veränderung nicht mehr feststellbar (Abb. 13). Auch die Glutaminsäure setzt zunächst die schon am 2. Induktionstag begonnene Konzentrationszunahme

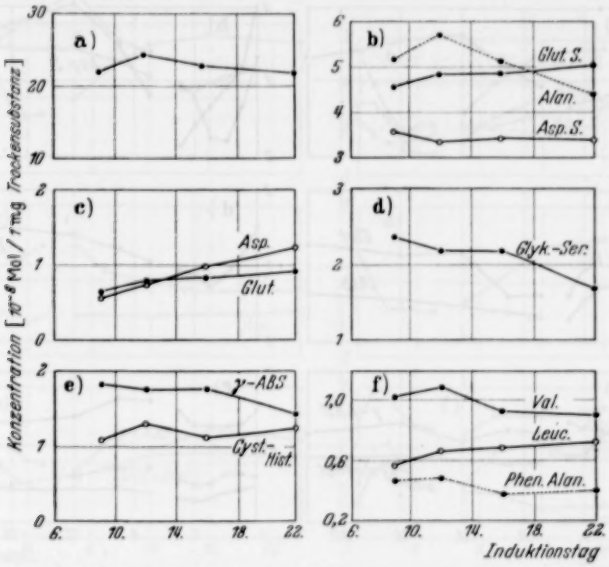


Abb. 12 a—f. In der 1. und 2. Phase photoperiodischer Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in den alten Blättern von *Kalanchoë Blossfeldiana*

fort, behält dann aber — nach dem 9. Tage — ihre Menge bei; die Asparaginsäure setzt den gleichen Anstieg bis zum 12. Tage fort und durchläuft dann am 16. Tage ein Minimum. Demgegenüber tritt das α-Alanin bis zum 16. Tage immer mehr zurück. Ähnlich wie schon in den alten Blättern lassen also die Grundaminosäuren auch in der Wurzel kein vergleichbares Verhalten erkennen.

Einander sehr ähnliche Kurven liefern dagegen die beiden Amide, die bis zum 16. Tage abfallen, dann mehr oder weniger deutlich wieder ansteigen. Umgekehrt wird die Serin-Glykokoll-Fraktion bis zum 16. Tage auf einen unverhältnismäßig hohen Wert vermehrt; sie fällt dann schwach wieder ab. Die Konzentration des Cystein-Histidin geht sehr erheblich zurück, während die γ-Aminobuttersäure nach Erreichen ihres Konzentrationsmaximums (am 9. Tage) langsam wieder absinkt.

Leucin, Valin und Phenylalanin sinken auf Minima am 12. Tage ab; die späteren Mengenveränderungen liegen innerhalb der Fehlergrenze der Methode.

*c) Längsgradienten der Aminosäurekonzentration*

In vegetativen *Kalanchoë*-Exemplaren zeigen nahezu alle Aminosäuren ein Konzentrationsmaximum in der Wurzel, eine Minimalkonzentration dagegen in den jüngsten oder mittleren Blättern (s. oben). So ergeben sich für alle Komponenten weitgehend übereinstimmende Längs-

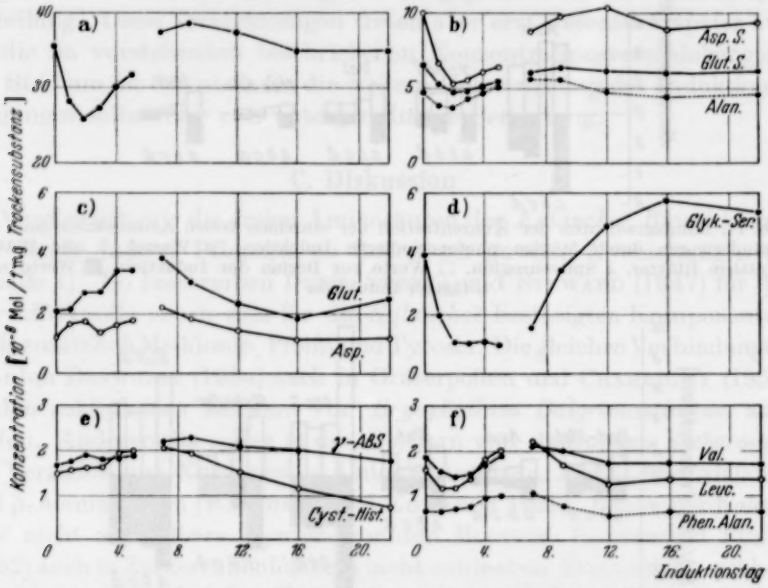


Abb. 13 a—f. In der 1. und 2. Phase photoperiodischer Induktion ablaufende Veränderungen der Gesamtmenge (a) und Konzentrationsschwankungen der Einzelkomponenten (b—f) der Aminosäurefraktion in den Wurzeln von *Kalanchoë Blossfeldiana*

gradienten. Die Abb. 14 zeigt eine graphische Gegenüberstellung derartiger Gradienten der Langtag-Kontrolle mit denen nach Abschluß der Schwelleninduktion (5 Induktionstage).

Sieht man von der Verschiebung beim α-Alanin ab, so hat die Induktion die Maximumlage nicht geändert. Ob auch die Minimumlage unbeeinflußt blieb, ist leider nicht zu beurteilen, da die Blätter der ältesten Sproßregion zum Vergleich nicht zur Verfügung standen (s. oben). Auch die Verschiebungen in den relativen Mengenverhältnissen sind i. a. verhältnismäßig gering; allein beim Serin-Glykokoll ist eine beträchtliche Mengenabnahme festzustellen.

Dagegen kommt es bei der weiteren Behandlung der Pflanzen zu weit deutlicheren Änderungen: Nehmen wir als Vergleichspunkt den

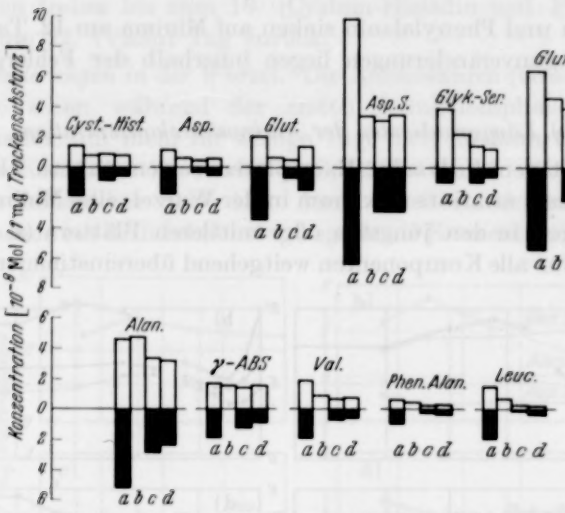


**Abb. 14.** Längsgradienten der Konzentration der einzelnen freien Aminosäuren und ihre Veränderungen durch 5tägige photoperiodische Induktion. *a* Wurzel, *b* alte Blätter, *c* mittlere Blätter, *d* Spitzenregion. □ Werte vor Beginn der Induktion, ■ Werte nach 5tägiger Induktion

**Abb. 15.** Längsgradienten der Konzentration der einzelnen freien Aminosäuren und ihre Veränderungen durch 12tägige photoperiodische Induktion. *a* Wurzel, *b* alte Blätter, *c* mittlere Blätter, *d* Spitzenregion. □ Werte vor Beginn der Induktion, ■ Werte nach 12tägiger Induktion

12. Induktionstag — an diesem Termin ist mit der Lupe die erste Anlage der jungen Blütenknospen zu erkennen —, so ergibt sich ein verändertes Bild (Abb. 15). Wohl bleibt — abgesehen vom α-Alanin und Phenyl-

alanin — in allen Fällen die Maximumlage erhalten, nicht dagegen die Lage der Minimalkonzentration. Soweit diese verändert wird, verschiebt sie sich in Richtung auf die älteren Teile.

Länger dauernde Kurztag-Behandlung vermag demnach auch die Konzentrationsgradienten zu beeinflussen. Die am 12. Induktionstage zum ersten Mal erkennbaren Veränderungen nahmen mit fortgesetzter Kurztagbehandlung noch zu. Demnach kommt es beim Übergang der *Kalanchoë* von der vegetativen zur reproduktiven Phase ihrer Entwicklung auch zu einer Veränderung der Längsgradienten der Aminosäureverteilung. Diese Veränderungen treten aber erst wesentlich später auf als die im vorstehenden beschriebenen Konzentrationsverschiebungen. Ihr Studium ist demnach für die weitere Untersuchung des Induktionsvorganges selbst nur von untergeordneter Bedeutung.

## C. Diskussion

Vergleichen wir die freien Aminosäuren der *Kalanchoë Blossfeldiana* mit denen anderer Pflanzen, so finden wir gewisse Abweichungen (s. Tabelle 1). So beschreiben Dent, Stepka und Steward (1947) für die Kartoffelknolle neben den für die *Kalanchoë* bestätigten Komponenten noch zusätzlich Methionin, Prolin und Tyrosin. Die gleichen Verbindungen konnten Bathurst (1954) auch in Gräserpollen und Champigny (1955) in den sukkulenten Blättern von *Bryophyllum Daigremontianum* auffinden. Andererseits sollen in den Blättern von *Andropogon ischaemum* im Vergleich zur *Kalanchoë* $\gamma$-Aminobuttersäure, Serin, Phenylalanin und $\beta$-Alanin fehlen (Rabideau und Edwards 1951). Das in der *Kalanchoë* nicht auffindbare Tyrosin konnten Blouch, Payne und Fults (1952) auch in Zuckerrübenblättern nicht entdecken. Erst nach Besprühen der Blätter mit Zinkdimethyldithiocarbamat ließ sich diese Aminosäure — vermutlich jedoch als Spaltprodukt hydrolysierter Zellproteine — nachweisen.

Während wir in der Wurzel der *Kalanchoë* deutliche Mengen von Glutamin und Asparagin nachweisen konnten, fanden Virtanen und Miettinen (1952) diese Amide nicht in der *Alnus*-Wurzel; sie werden dort anscheinend durch das Citrullin ersetzt.

Mit der Aussage, eine bestimmte Aminosäure komme nicht vor, sollte man jedoch sehr vorsichtig sein; es muß immer damit gerechnet werden, daß sehr geringe Mengen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Reagentien bleiben können. Auch ist es möglich, daß selbst bei zweidimensionaler Trennung in mehreren Lösungsmittel-Kombinationen einzelne Komponenten durch die beständige Überlagerung durch weit höher konzentrierte Begleiter der Beobachtung entgehen. Andererseits sollten Untersuchungen freier Aminosäuren nur an frisch geerntetem oder aber gefriergetrocknetem Material angestellt werden, da bei der Hitzetrocknung — abgesehen von nichtenzymatischen Transaminierungen (Giri, Kalyankar und Vaidyanathan 1954) — eine Autolyse von Zellproteinen einsetzen kann,

Tabelle 1. *Zusammensetzung der freien Aminosäuren in verschiedenen Pflanzen*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Kalanchoë Blossfeldiana* | *Pisum sativum* | Graspollen | *Solanum tuberosum* (Knollen) | *Bryophyllum Daigremontianum* | *Malus silvestris* (Frucht) | *Alnus* spec. | *Spinacea oleracea* | *Spirodela polyrrhiza* | *Lemna minor* | *Lupinus albus* | *Andropogon ischaemum* |
| Cystein-Cystin | +(+) | + | — | + | — | — | — | + | + | + | ? | — |
| Histidin | +(+) | + | + | + | — | — | ? | + | + | + | ? | — |
| Arginin | +(+) | + | + | + | — | — | + | + | + | + | + | — |
| Lysin | +(+) | + | + | + | — | — | ? | + | + | + | + | + |
| Asparagin | +(?) | + | + | + | — | + | — | ? | ? | ? | + | + |
| Glutamin | +(?) | + | + | + | — | + | — | ? | ? | ? | + | + |
| Glykokoll | +(+) | — | + | + | + | + | ? | + | + | + | ? | — |
| Serin | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | — |
| Asparaginsäure | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | + |
| Glutaminsäure | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | + |
| Threonin | +(+) | — | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | + |
| α-Alanin | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | + |
| β-Alanin | +(—) | + | — | + | — | + | — | — | — | — | + | — |
| Prolin | —(+) | + | + | + | — | + | — | + | + | + | + | — |
| Oxyprolin | —(—) | ? | ? | ? | — | ? | ? | + | + | + | ? | — |
| γ-Aminobuttersäure | +(—) | + | — | + | + | + | + | ? | ? | ? | + | — |
| Valin | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | + |
| Methionin | —(+) | — | + | + | — | + | ? | + | + | + | — | + |
| Tyrosin | —(+) | — | + | + | + | + | ? | + | + | + | — | — |
| Tryptophan | ?(+) | + | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Phenylalanin | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | — |
| Leucin-Isoleucin | +(+) | + | + | + | + | + | ? | + | + | + | + | + |
| Ornithin | —(—) | ? | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — |
| Citrullin | —(—) | ? | — | + | — | — | + | — | — | — | — | — |
| Homoserin | —(—) | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Pipecolinsäure | —(—) | ? | — | — | — | + | — | — | — | — | + | — |
| Taurin | —(—) | — | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — |

Spalte 1: eingeklammerte Zeichen = Aminosäuren der *Kalanchoë*-Zellproteine (nach METZNER 1955), Spalte 2: VIRTANEN und MIETTINEN (1953), Spalte 3: BATHURST (1954), Spalte 4: DENT, STEPKA und STEWARD (1947), Spalte 5: CHAMPIGNY (1955), Spalte 6: MCKEE und URBACH (1953), Spalte 7: MIETTINEN und VIRTANEN (1952), Spalte 8—10: KESER (1955), Spalte 11: STEWARD, WETMORE, THOMPSON und NITSCH (1954), Spalte 12: RABIDEAU und EDWARDS (1951).

durch die die Zusammensetzung der ungebundenen Aminosäuren unkontrollierbar verfälscht werden muß.

Die vorliegenden Resultate sollen nicht zu einer Deutung stoffwechselphysiologischer Zusammenhänge zwischen den einzelnen Aminosäuren benutzt werden. Vielmehr kommt es in erster Linie auf eine Betrachtung der Grundaminosäuren und deren zahlenmäßigen Anteil an der Gesamt-

fraktion der Aminosäuren an. Glutamin- und Asparaginsäure entstehen unmittelbar aus den beiden im Krebscyclus auftretenden α-Ketosäuren. Das α-Alanin dürfte an die Brenztraubensäure anzuschließen sein, auch wenn ein besonderes Ferment für deren Aminierung noch nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. VIRTANEN 1955)[1]. Alle übrigen Aminosäuren hingegen scheinen mit diesen drei Komponenten über transaminierende Fermentsysteme in Verbindung zu stehen. Vermutlich werden sie auch über entsprechende Umaminierungsschritte gebildet; die erforderlichen α-Ketosäuren sind zum großen Teil bereits nachgewiesen worden (VIRTANEN 1955). β-Alanin kann allerdings auch durch Decarboxylierung aus der Asparaginsäure entstehen, ebenso γ-Aminobuttersäure aus der Glutaminsäure. Wir haben vorläufig aber noch keine Anhaltspunkte dafür, daß dieser — enzymatisch mögliche — Weg von der höheren Pflanze tatsächlich eingeschlagen wird; er stellt zunächst nur eine theoretische Möglichkeit dar.

Tabelle 2. *Menge der Grundaminosäuren in den verschiedenen Organen von Kalanchoë Blossfeldiana*

| Organe | Grundaminosäuren | Abgeleitete Aminosäuren | Mittlerer Fehler der Differenz |
|---|---|---|---|
| | in Prozent der Gesamtaminosäuren | | |
| Wurzeln . . . . . | 55,3 | 44,7 | 0,6 |
| Alte Blätter . . . | 60,7 | 39,3 | 0,3 |
| Mittlere Blätter . . | 61,2 | 38,8 | 0,8 |
| Junge Blätter . . | 60,7 | 39,3 | 0,6 |
| Infloreszenzen . . | 51,6 | 48,4 | — |

Die drei Grundaminosäuren treten bei der *Kalanchoë* mengenmäßig erheblich in den Vordergrund. Berechnet man für die einzelnen Organe ihre prozentuale Beteiligung an der Gesamtfraktion (Mittelwerte über die gesamten Versuchstage), so erhält man bemerkenswerte Unterschiede. Tabelle 2 läßt erkennen, daß *in den Blättern der Anteil an Grundaminosäuren am bedeutendsten* ist. Differenzen zwischen verschieden alten Blättern sind nicht nachweisbar. Dagegen besitzen die Wurzeln und ganz besonders auch die Blütenstände — statistisch gesichert — weniger Grundaminosäuren; das heißt aber nichts anderes, als daß ein größerer Prozentsatz ihrer freien Aminosäuren erst sekundär entstanden ist. Dieser Befund mag zeigen, daß die enzymatischen Prozesse in den einzelnen Zonen der *Kalanchoë* durchaus verschieden ablaufen können. Spätere Untersuchungen werden zu klären haben, inwieweit wir die Laubblätter als bevorzugte Produktionsstätten für Grundaminosäuren auffassen dürfen; möglicherweise beruhen die beobachteten Differenzen lediglich darauf, daß den einzelnen Pflanzenteilen voneinander abweichende Gleichgewichtslagen der Transaminierungsreaktionen zukommen.

[1] Ob noch weitere Aminosäuren primär entstehen können (cyclische Aminosäuren ?), ist noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden (vgl. THOMAS 1953, VIRTANEN 1955).

Die besondere Bedeutung der Laubblätter für den Aminosäurestoffwechsel wird aber aus weiteren Befunden deutlich: Die Abb. 16 zeigt eine graphische Darstellung der Mengenverhältnisse Glutaminsäure/Asparaginsäure, Glutaminsäure/Alanin und Asparaginsäure/Alanin. Sie läßt erkennen, daß die Quotienten in der Wurzel in der angegebenen Reihenfolge ansteigen, in mittleren und jungen Blättern dagegen absinken. Die Spitzenregion unterscheidet sich insofern von den übrigen Laubblättern, als hier das Verhältnis Glutaminsäure/Alanin besonders hoch ist. Dies besagt nun allerdings nichts weiter, als daß in den verschiedenen Organen auch verschiedene Grundaminosäuren in den Vordergrund treten.

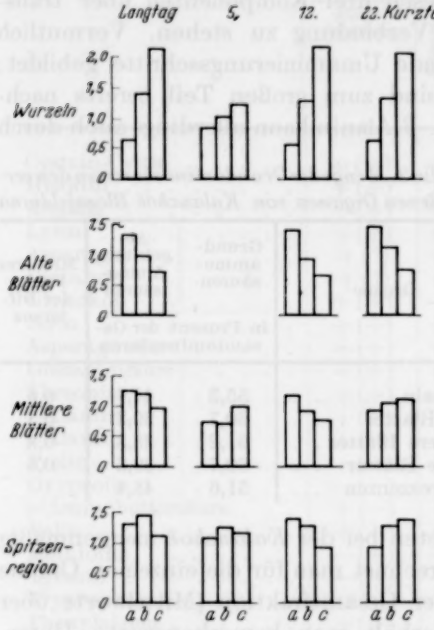


Abb. 16. Im Laufe der photoperiodischen Induktion auftretende Mengenänderungen der Grundaminosäuren in verschiedenen Organen von *Kalanchoë Blossfeldiana*. *a* Mengenverhältnis Glutaminsäure/Asparaginsäure, *b* Mengenverhältnis Glutaminsäure/Alanin, *c* Mengenverhältnis Asparaginsäure/Alanin

Weit wesentlicher ist daher die Betrachtung dieser Konzentrationsbeziehungen im Verlaufe der Induktion. Wie schon aus den Abb. 7—13 zu folgern ist, bleiben die drei Quotienten keineswegs konstant; die Abb. 16 zeigt ihre Schwankungen für vier aus dem Gang der Induktion herausgegriffene Zeitpunkte, und zwar für den 0. (Langtag-Kontrolle), 5., 12. und 22. Induktionstag. Wurzel und ältere Blätter stimmen insofern überein, als die Aufeinanderfolge der drei Quotienten konstant bleibt; in beiden Zonen kommt es also in den gegenseitigen Mengenverhältnissen der Grundaminosäuren zu keinen wesentlichen Verschiebungen[1]. Völlig anders ist das Bild für die mittleren und jüngeren Blätter. Hier werden die Relationen ständig gegeneinander verschoben. Das spricht dafür, daß in dieser Region die empfindlichste Reaktion auf die photoperiodische Induktion erfolgt. Dieses Ergebnis ist insofern besonders wichtig, als ja die mittlere Region die größte photoperiodische Sensibilität aufweist (s. oben), wohingegen die Spitzenzone — soweit sie selbst noch unempfindlich ist (s. oben) — ihren „Blühimpuls" gerade aus dieser Region zugeleitet erhält.

[1] Die Konstanz der Reihenfolge der drei Quotienten gilt auch für alle übrigen — hier nicht berücksichtigten — Induktionstage.

Vergleicht man die im Verlaufe der Induktion beobachteten Mengenänderungen der freien Aminosäuren mit denen der in den Zellproteinen der Spitzenregion festgelegten Eiweißbausteine (METZNER 1955), so läßt sich kein Zusammenhang erkennen. Jedenfalls ist es keineswegs so, daß die freien Aminosäuren ein Spiegelbild der gebundenen Aminosäuren darstellen. Die bei der Proteinhydrolyse freigesetzten Komponenten bleiben demnach nicht unverändert liegen, sondern werden rasch transaminiert, zum Teil vielleicht auch noch anderen Umbauprozessen unterworfen, so daß sich aus ihrer Zusammensetzung keinesfalls auf die der hydrolysierten Proteine zurückschließen läßt. So treten z. B. Prolin, Tyrosin und Methionin nicht als freie Komponenten auf, obgleich sie als Eiweißbausteine, zum Teil in erheblicher Konzentration, nachgewiesen werden konnten.

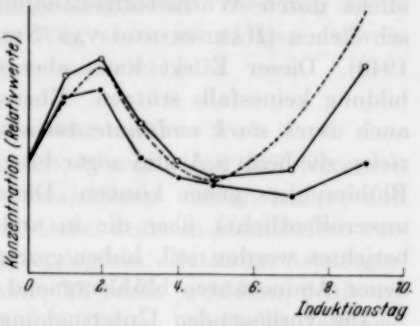


Abb. 17. Vergleich der im Verlaufe photoperiodischer Induktion von Kurztagpflanzen auftretenden Konzentrationsänderungen freien Auxins und freier Aminosäuren. ●—● Phenylalanin, ○—○ Valin (Spitzenregion von *Kalanchoë Blossfeldiana*), ---- freies Auxin (für *Xanthium*, nach COOKE 1954)

Aus der Tatsache, daß eine bestimmte Substanz im Verlaufe der photoperiodischen Induktion ihre Konzentration ändert, darf selbstverständlich nicht geschlossen werden, daß sie für den eigentlichen Differenzierungsprozeß von Bedeutung ist. Ebenso wie für die hier untersuchten Aminosäuren gilt dies auch für andere Pflanzeninhaltsstoffe. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Wirkstoffe, über deren physiologische Bedeutung wir im einzelnen besser unterrichtet sind als über die Rolle einzelner Aminosäuren[1]. So sind Mengenunterschiede des freien Auxins in blühenden und vegetativen Exemplaren photoperiodisch empfindlicher Pflanzen mehrfach beschrieben worden (ČAJLACHJAN und ŽDANOVA 1938, BONNER 1940, v. WITSCH 1941 u. a.); exakte Untersuchungen haben aber auch in diesem Falle gezeigt, daß keine kontinuierliche Zu- oder Abnahme vorliegt, sondern daß Wendepunktskurven durchlaufen werden, wie dies sowohl bei den freien als auch bei den in den Zellproteinen festgelegten Aminosäuren der Fall ist. Die Abb. 17 gibt einen Vergleich der quantitativen Veränderungen einzelner Aminosäuren mit den von COOKE (1954) bei der Induktion von Kurztagpflanzen beobachteten Auxinschwankungen.

[1] Über eine spezielle physiologische Funktion sind wir nur bei wenigen Aminosäuren unterrichtet. So vermag das Tyrosin offenbar Zellteilungen auszulösen (ORSÓS 1936), Histidin beschleunigt die Plasmaströmung (FITTING 1933), während andere Komponenten den Sauerstoffverbrauch der Gewebe erhöhen (ZANONI 1950).

Aus der von COOKE gemessenen Wendepunktskurve kann man unmöglich schließen, daß die Blütenbildung allein durch eine Herabsetzung des Auxinspiegels hervorgerufen wird. Die Menge freien Auxins steigt ja gerade im Verlaufe der für die Umstimmung des Vegetationspunktes entscheidenden Induktionsphase an. Die vielfach in der Literatur vertretene Ansicht, daß es sich bei der $\beta$-Indolylessigsäure um einen Antagonisten des hypothetischen „Blühhormons" handelt (v. DENFFER 1950 u. a.), resultiert ja auch vielmehr aus der Möglichkeit, den Blüheffekt durch Wuchsstoffbehandlung der induzierten Pflanzen abzuschwächen (HARDER und VAN SENDEN 1949, BONNER und THURLOW 1949). Dieser Effekt kann aber die „Auxinhypothese" der Blütenbildung keinesfalls stützen. Ebenso wie durch das Heteroauxin sind auch *durch stark verdünnte Aminosäurelösungen Blühhemmungen zu erzielen*, die beim $\alpha$-Alanin sogar bis zur völligen Aufhebung eines starken Blühimpulses gehen können. Diese Versuche (METZNER und MADAN, unveröffentlicht), über die in anderem Zusammenhang ausführlicher berichtet werden soll, haben gezeigt, daß die Injektion sehr verschiedener Aminosäuren blühhemmend wirkt.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen den bereits aus den Analysen der Zellproteine (METZNER 1955) gezogenen *Schluß, daß es im Verlaufe der photoperiodischen Induktion zu einer bedeutenden Umstimmung des Stoffwechsels kommt, vor allem in den photoperiodisch maximal empfindlichen Blättern mittleren Alters sowie in den Vegetationskegeln*. Wenn wir diese Veränderungen mit den Primärreaktionen der Pflanze auf den veränderten Licht-Dunkel-Rhythmus in Zusammenhang bringen wollen, so wird dies gerechtfertigt durch die außerordentlich rasche Reaktion auf die induktiv wirksamen Bedingungen. Wird diese Umsteuerung des Stoffwechsels gestört, z. B. durch die gleichzeitige Zufuhr physiologisch aktiver Substanzen, so muß mit einer Beeinträchtigung des Blüheffektes gerechnet werden, gleich ob es sich bei dieser „Störungssubstanz" um einen Wachstumsregulator oder etwa um eine Aminosäure handelt. Den Mangel spezifischer Effekte bei der Blühhemmung durch Antiauxine haben bereits HARDER und OPPERMANN (1952) erkannt. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß es umgekehrt durch eine „Störung" des „normalen" Stoffwechsels zu Prozessen kommen kann, die letztlich auf eine Blütenbildung unter nichtinduktiven Bedingungen hinauslaufen. So sind Förderungen der Blütenbildung sowohl durch Auxin (VAN OVERBEEK 1946), als auch durch das Antiauxin 2,3,5-Trijodbenzoesäure (ZIMMERMANN und HITCHCOCK 1942, 1949, DE WAARD und RODENBURG 1948) beschrieben worden.

Selbstverständlich sind Einblicke in die bei der photoperiodischen Induktion ablaufenden Prozesse auch dadurch zu gewinnen, daß man der induzierten Pflanze von außen her physiologisch aktive Substanzen

zuführt. Wirkliche Aufschlüsse aber sind aus derartigen Versuchen nur dann zu erwarten, wenn man gleichzeitig den Einfluß dieser Substanzen auf den Stoffwechsel untersucht. Wichtigste Voraussetzung ist selbstverständlich, daß wir denjenigen Zeitraum berücksichtigen, in dem sich die Umstimmung des Vegetationspunktes abspielt. Stoffliche Veränderungen, die erst nach Wochen erfaßbar sind, haben für das Studium der Blütenbildung nur sehr geringes Interesse.

Schon die ersten Untersuchungen zur Biochemie der induzierten Pflanze haben wichtige Zusammenhänge aufgedeckt. Dies mag rechtfertigen, den eben erst beschrittenen Weg weiterzuverfolgen und die Analysen auch auf andere Stoffklassen auszudehnen.

## Zusammenfassung

Die freien Aminosäuren von Blättern, Wurzeln und Inflorescenzen der Kurztag-*Crassulacee Kalanchoë Blossfeldiana* wurden isoliert und papierchromatographisch fraktioniert. Dabei konnten identifiziert werden: Cystein, Histidin, Lysin, Asparagin, Arginin, Glutamin, Asparaginsäure, Serin, Glykokoll, Glutaminsäure, Threonin, α-Alanin, β-Alanin, γ-Aminobuttersäure, Valin, Phenylalanin, Leucin und/oder Isoleucin sowie Tryptophan.

Die größte Aminosäuremenge wurde in den Wurzeln sowie in den voll entwickelten Inflorescenzen gefunden, die Minimalkonzentration in den Blättern mittleren Alters.

Von den drei Grundaminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure und α-Alanin) überwiegt in den Wurzeln die Asparaginsäure, in allen oberirdischen Teilen von Langtag-Exemplaren dagegen die Glutaminsäure oder das α-Alanin. In ausgebildeten Inflorescenzen herrscht im Gegensatz zu allen anderen oberirdischen Teilen der *Kalanchoë* die Asparaginsäure vor.

Die quantitative Auswertung der Papierchromatogramme zeigte, daß sich im Laufe einer mehrtägigen photoperiodischen Induktion in der Sproßspitze und in den — photoperiodisch maximal empfindlichen — Laubblättern mittleren Alters bedeutende Veränderungen in den gegenseitigen Mengenverhältnissen der Grundaminosäuren vollziehen. Darüber hinaus lassen auch die übrigen Aminosäuren schon in den ersten Induktionstagen deutliche Mengenänderungen erkennen, die in den einzelnen Zonen nach Richtung und Amplitude verschieden sind.

Ein unmittelbarer Vergleich der beobachteten Konzentrationsverschiebungen der freien Aminosäuren mit denen der in den Zellproteinen des Vegetationskegels festgelegten Aminosäuren erwies sich als nicht möglich, doch erfolgen die Änderungen in beiden Fraktionen in vergleichbaren Zeiträumen.

Herrn Professor Dr. R. HARDER möchte ich für die Anregung zu diesen Untersuchungen und die freundliche Aufnahme in seinem Institut herzlich danken. Herrn Privatdozent Dr. HELMUT METZNER bin ich für seine stete und wirksame Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente zu besonderem Dank verpflichtet.

## Literatur

BATHURST, N. O.: The amino acids of grass pollen. J. of exper. Bot. **5**, 253 (1954). — BERRY, H. K., and L. CAIN: Biochemical individuality. IV. A paper chromatographic technique for determining excretion of amino acids in the presence of interfering substances. Arch. of Biochem. **24**, 179 (1949). — BLOUCH, R., M. G. PAYNE and J. L. FULTS: Free amino acids in sugar-beet leaves altered by zinc dimethyldithiocarbamate. Bot. Gaz. **114**, 248 (1952). — BONNER, J.: Further experiments on flowering in *Xanthium*. Bot. Gaz. **110**, 625 (1949). — BONNER, J., and J. F. THURLOW: Inhibition of photoperiodic induction in *Xanthium* by applied auxin. Bot. Gaz. **110**, 613 (1949). — ČAJLACHJAN, M. C. i L. P. ŽDANOVA: The role of growth hormones in form-building processes. III. Effect of heteroauxin treatment of seeds upon growth and development of plants. C. r. Acad. Sci. URSS., N. S. **19**, 303 (1938). — CHAMPIGNY, M.: Les acides aminés libres, les acides aminés des peptides et des protéines dans les feuilles des *Bryophyllum Daigremontianum*. C. r. Acad. Sci. Paris **240**, 1257 (1955). — COOKE, A. R.: Changes in free auxin content during the photoinduction of short day plants. Plant Physiol. **29**, 440 (1954). — DENFFER, D. v.: Blühhormon oder Blühhemmung? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. Naturwiss. **37**, 296, 317 (1950). — DENT, C. E., W. STEPKA and F. C. STEWARD: Detection of free amino acids of plant cells by partition chromatography. Nature (Lond.) **160**, 682 (1947). — EGUCHI, T.: Effects of the day length upon the time of differentiation of flower bud and the subsequent development of flowering. Proc. imp. Acad. (Tokyo) **13**, 332 (1937). — EHRENBERG, M.: Über die Bestimmung von Fermenten in Gegenwart von Gerbstoffen. (Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in Blättern der Crassulacee *Kalanchoë Blossfeldiana*.) Biochem. Z. **325**, 102 (1954). — FITTING, H.: Untersuchungen über die Empfindlichkeit und das Unterscheidungsvermögen der *Vallisneria*-Protoplasten für verschiedene α-Aminosäuren. Jb. Bot. **77**, 1 (1933). — GALSTON, A. W.: The effect of 2,3,5-triiodobenzoic acid on the growth and flowering of soybeans. Amer. J. Bot. **34**, 356 (1947). — GIRI, K. V., G. D. KALYANKAR u. C. S. VAIDYANATHAN: On the reaction of keto acids with amino acids. Naturwiss. **41**, 14 (1954). — GREGORY, F. G., J. SPEAR and K. V. THIMANN: The interrelation between $CO_2$ metabolism and photoperiodism in *Kalanchoë* I. Plant Physiol. **29**, 220 (1954). — HAMNER, K. C., and J. BONNER: Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. Bot. Gaz. **100**, 388 (1938). — HARDER, R.: Über photoperiodisch bedingte Organ- und Gestaltbildung bei den Pflanzen. Naturwiss. **33**, 41 (1946). — Vegetative and reproductive development of *Kalanchoë Blossfeldiana* as influenced by photoperiodism. Symposia Soc. exper. Biol. **2**, 117 (1948). — Über den Einfluß der Tageslänge nach der photoperiodischen Induktion auf die Infloreszenzen von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Planta (Berl.) **42**, 19 (1953). — HARDER, R., u. O. BODE: Über die Wirkung von Zwischenbelichtungen während der Dunkelperiode auf das Blühen, die Verlaubung und die Blattsukkulenz bei der Kurztagspflanze *Kalanchoë Blossfeldiana*. Planta (Berl.) **33**, 469 (1943). — HARDER, R., u. G. GÜMMER: Über die untere kritische Tageslänge bei der Kurztagspflanze *Kalanchoë Blossfeldiana*. Planta (Berl.) **35**, 88 (1947). — HARDER, R., u. A. OPPERMANN: Einfluß von 2,3,5-Trijodbenzoesäure auf die Blütenbildung und die vegetative Gestaltung von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Planta

(Berl.) **41**, 1 (1952). — HARDER, R., u. H. VAN SENDEN: Antagonistische Wirkung von Wuchsstoff und Blühhormon. Naturwiss. **36**, 348 (1949). — HARDER, R., u. H. v. WITSCH: Wirkung von Photoperiodismus und Jarowisation auf die Blütenbildung von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Gartenbauwiss. **15**, 226 (1940). — HAUSCHILD, I.: Über die an der photoperiodischen Reaktion der Kurztagspflanzen beteiligten Vorgänge. Diss. Math.-naturwiss. Fakultät Göttingen 1943. — KESER, M.: Papierchromatographische Untersuchungen über das Auftreten freier und gebundener Aminosäuren in höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **45**, 273 (1955). — KUTSKY, P. B., R. M. EAKIN, W. E. BERG and J. L. KAVANAN: Protein metabolism of amphibian embryos. IV. Quantitative changes in free and non-protein amino acids. J. of Exper. Zool. **124**, 263 (1953). — LAIBACH, F.: Wuchsstoff und Blütenbildung. Beitr. Biol.Pflanz. **29**, 129 (1952). — MCCOY, T. A., T. H. SUBLETT and V. W. DOBBS: The relation of the amino acid composition to the development of oats (a long-day plant). Plant Physiol. **28**, 77 (1953). — MCKEE, H. S., and G. E. URBACH: The physiology of growth in apple fruits. V. Soluble nitrogen constituents. Austral. J. biol. Sci. **6**, 369 (1953). — METZNER, H.: Unterschiede in der Eiweißfraktion bei Lang- und Kurztagsexemplaren von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. IIb **1954** a, 19. — Beziehungen zwischen Eiweißstoffwechsel und Blütenbildung. Kongr.ber. Internat. Photobiol. Kongr. Amsterdam 1954 b (im Druck). — Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induktion. Planta (Berl.) **45**, 493 (1955). — MIETTINEN, J. K., u. A. I. VIRTANEN: The free amino acids in the leaves, roots and root nodules of the alder *(Alnus)*. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 540 (1952). — MURNEEK, A. E.: Biochemical studies of photoperiodism in plants. Mo. Agr. Exper. Stn. Res. Bull. **1937**, 2628. — ORSÓS, O.: Untersuchungen über die sogenannten Nekrohormone. Protoplasma (Berl.) **26**, 351 (1936). — OVERBEEK, J. VAN: Control of flower formation and fruit size in the pineapple. Bot. Gaz. **108**, 64 (1946). — PARKER, M. W., and H. A. BORTHWICK: Effect of photoperiod on development and metabolism of the Biloxi soybean. Bot. Gaz. **100**, 651 (1939). — RABIDEAU, G. S., and M. B. EDWARDS: Nitrogen and amino acid content of the various parts of *Andropogon ischaemum* L. Plant Physiol. **26**, 798 (1951). — REDFIELD, R. R., and E. S. G. BARRON: Quantitative determination of amino acids in protein hydrolyzates by paper chromatography. Arch. of Biochem. a. Biophysics **35**, 443 (1952). — SENDEN, H. VAN: Untersuchungen über den Einfluß von Heteroauxin und anderen Faktoren auf die Blütenbildung bei der Kurztagspflanze *Kalanchoë Blossfeldiana*. Biol. Zbl. **70**, 537 (1951). — SIRCAR, S. M., and B. N. DE: Studies in the physiology of rice. IV. The effect of photoperiodic induction on nitrogen metabolism of winter paddy. Proc. Nat. Inst. Sci. India **14**, 263 (1948). — STEWARD, F. C., R. H. WETMORE, J. H. THOMPSON and J. P. NITSCH: A quantitative chromatographic study of nitrogenous components of shoot apices. Amer. J. Bot. **41**, 123 (1954). — THOMPSON, J. F., R. M. ZACHARIAS and F. C. STEWARD: Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper — A quantitative procedure. Plant Physiol. **26**, 375 (1951). — THURLOW, J. F., and J. BONNER: Inhibition of photoperiodic induction in *Xanthium*. Amer. J. Bot. **34**, 603 (1947). — TURBA, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954. — VIRTANEN, A. I.: Neue Amino- und Ketosäuren in grünen Pflanzen und die Biosynthese der Aminosäuren. Angew. Chem. **67**, 381 (1955). — VIRTANEN, A. I., and J. K. MIETTINEN: Free amino acids in the leaves, roots and root-nodules of the alder *(Alnus)*. Nature (Lond.) **170**, 283 (1952). — On the composition of the soluble nitrogen fraction in the pea plant and alder. Biochim. et biophysica Acta **12**, 181 (1953). — WAARD, J. DE, u. J. W. M. ROODENBURG: Premature flower-bud initiation in tomato-seedlings caused by 2,3,5-triiodobenzoic

acid. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. **51**, 248 (1948). — Witsch, H. v.: Über den Zusammenhang zwischen Membranbau, Wuchsstoffwirkung und der Sukkulenzzunahme von *Kalanchoë Blossfeldiana* im Kurztag. Planta (Berl.) **31**, 638 (1941). — Zanoni, G.: Azione degli aminoacidi sul ricambio respiratorio e fotosintetico delle piante. Nota I. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **26**, 1297 (1950). — Zeist, W. v., and T. C. M. Koevoets: *Kalanchoë Blossfeldiana* treated with 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA). Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. **54**, 3 (1951). — Zimmermann, P. W., and A. E. Hitchcock: Flowering habit and correlation of organs modified by triiodobenzoic acid. Contrib. Boyce Thompson Inst. **12**, 491 (1942). — Triiodobenzoic acid influences flower formation in tomatoes. Contrib. Boyce Thompson Inst. **15**, 353 (1949).

Dr. Chaman Lal Madan, Deshbandhu College, New Delhi/Indien

Planta, Bd. 47, S. 81—104 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Stuttgart
und dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

# ZUR PHYSIOLOGIE DER FROSTHÄRTUNG
## (UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON WINTERWEIZEN)

Von
KURT JEREMIAS

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 22. Dezember 1955)*

## A. Einleitung

Auf die Erscheinung der „Frosthärtung", d. i. eine durch äußere Umstände bedingte Zunahme der Frostresistenz, machte bereits 1830 GÖPPERT aufmerksam, und seither ist dieses Problem zum Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gemacht worden. Es sei hier auf die zusammenfassenden Darstellungen von LUYET u. GEHENIO (1940), FUCHS u. ROSENSTIEL (1941) und ULLRICH (1943, 1944) verwiesen.

Es darf heute wohl als sicher angenommen werden, daß die abgehärteten Pflanzen gegen die Wirkung tiefer Temperaturen vor allem dadurch geschützt sind, daß das Wasserbindungsvermögen des Plasmas relativ geändert wird (ROSA 1920, 1921, NEWTON 1924, BOBKO u. POPOWA 1929, DEXTER 1932, 1934, LEVITT u. SCARTH 1936, KESSLER u. RUHLAND 1938, LEVITT 1939, LUYET u. GEHENIO 1940, TONZIG 1941, ULLRICH 1943, HENCKEL 1946 u. a.). Während des Abhärtungsvorganges wird also offenbar die freie Beweglichkeit der Wassermoleküle innerhalb des Plasmas herabgesetzt bzw. eingeschränkt.

ROSA glaubte Grund zu der Annahme zu haben, daß eine solche Wasserbindung in der Hauptsache durch Pentosane bewirkt wird. DE LONG (1924), NEWTON u. BROWN (1926) und DOYLE u. CLINCH (1926) hielten dafür andere hydrophile Kolloide für verantwortlich.

TONZIG hat in diesem Zusammenhang auf Kohlenhydrat-Protein-Komplexe aufmerksam gemacht, deren Vorkommen in pflanzlichen Zellen nach seinen Untersuchungen wahrscheinlich ist (1935, 1936, 1937). In einer großangelegten im wesentlichen theoretischen Arbeit (1941) schreibt er diesen Stoffen eine bedeutende Rolle im gesamten Wasserhaushalt der Zellen zu. Vor allem betont er den stabilisierenden Einfluß dieser „Muco-Proteidi" auf die Kälte- und Trockenresistenz der Pflanzen.

Solche oder ähnliche Verbindungen, hinsichtlich deren chemischer Konstitution insbesondere auf MEYER (1945) und BLIX (1951) verwiesen sei, haben in letzter Zeit in der Tier- und Humanphysiologie ein steigendes Interesse gefunden. Sie werden besonders für die hohe Viskosität gewisser tierischer Gewebe und Körperflüssigkeiten verantwortlich gemacht. Auch sollen Muco-Proteide als

Schranken für Wasseraustauschvorgänge und Diffusionen innerhalb der Gewebe dienen und zusammen mit einem Fermentkomplex, den man allgemein als „Hyaluronidase" bezeichnet, die Gewebspermeabilität insbesondere höherer tierischer Organismen kontrollieren (s. u. a. BRÜGEL 1952). Es wäre denkbar, daß auch innerhalb der Zellen höherer Pflanzen solchen oder ähnlichen Substanzen eine gewisse Bedeutung zukommen könnte.

KESSLER u. RUHLAND (1938), die bei frostgehärtetem Material eine erhöhte Hydratation des Plasmas gegenüber den Kontrollen feststellten, hatten, ebenso wie STÅLFELT (1949), auf eine Beeinflussung dieser erwähnten Plasmahydratation auf verschiedenem stofflichen Wege hingewiesen.

Es mußte also nunmehr die Frage interessieren, ob sich im Verlaufe der Frosthärtung zunächst irgendwelche stofflichen Änderungen in bezug auf plasmatisches Wasserbindungsvermögen nachweisen lassen und inwieweit sich die Hypothese von TONZIG, daß es sich hierbei um Muco-Proteide handelt, bestätigen läßt. Andererseits sollte aber auch untersucht werden, ob während der Frosthärtung der Pflanzen wirkstoffartige Substanzen auftreten, welche irgendeinen Plasma-ändernden Einfluß besitzen. Über derartige Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

## B. Experimenteller Teil

### *1. Material*

Die Versuche wurden an Winterweizen durchgeführt, von dem insgesamt sechs verschieden frostharte Sorten zur Verfügung standen und zwar (in der Reihenfolge abnehmender Frosthärte): *Engelens Siegfried*; *Criewener 192*; *Lohmann's Weender 3*; *Taca*; *Hauter's II* und *Marquardt II*.

Die Aussaat erfolgte teils im Freien, teils im Gewächshaus. Mit den Versuchen wurde begonnen, nachdem die Freilandpflanzen zwei Blätter ausgebildet und auch reichlich Zeit zur Abhärtung gehabt hatten. Bei der Materialentnahme wurde jeweils darauf geachtet, daß das Freilandmaterial gut abgehärtet war und daß einige Tage vorher keine Temperaturen über $+6^{0}$ C herrschten. Während 1952/53 alle benutzten Sorten gut über den Winter kamen, winterten 1953/54 — bedingt durch die starke Kälte Anfang Februar 1954 — die Sorten *Hauter's II* vollständig und *Marquardt II* zu ca. $^{3}/_{4}$ aus.

Eine statistische Sicherung cytologischer Ergebnisse ist wegen der nicht genau faßbaren Unterschiede immer schwer zu erreichen. Es wurden mindestens je 10 Präparate in drei verschiedenen Versuchsreihen (also insgesamt jeweils 30) den Ergebnissen zugrunde gelegt. Abweichungen nach unten sind bei den entsprechenden Versuchen vermerkt. — Bei den Kohlenhydratbestimmungen mit Anthron und Orcin wurden jeweils zwei Ansätze fünfmal kolorimetriert und aus den gewonnenen Werten das arithmetische Mittel gezogen. Damit ist eine quantitative Angabe über die statistische Sicherung aber noch nicht gegeben. — Die Frosthärtebestimmungen erfolgten mit Reihen von jeweils 20 Pflanzen. Mindestens fünf Reihen wurden jedesmal getestet und daraus das arithmetische Mittel genommen. — Die Viskositätswerte sind Mittel aus je 10—12 Einzelmessungen.

*2. Cytologische Untersuchungen*

Zunächst wurde im Anschluß an die schon oben erwähnten Beobachtungen von TONZIG versucht, das Auftreten von „Muco-Proteiden" in den Zellen selbst festzustellen.

**a) Färbeversuche.** α) *Eisen-Hämatoxylin.* Die dicht über der Erdoberfläche abgeschnittenen Blätter der Pflanzen wurden in Glasschalen mit Wasser gut abgespült (wobei bei frostgehärtetem Material Eiswasser benutzt wurde) und zwischen Filtrierpapier kurz abgetrocknet. Dann wurden vorsichtig kleine Epidermisstückchen abpräpariert und in reinem Aethylalkohol fixiert (TONZIG 1937). Um eine zu starke Plasmaschrumpfung zu verhindern, erfolgte diese Fixierung in steigender Konzentration (40%, 60%, 80%, 96%) während insgesamt 48 Stunden. TONZIG (1937) schreibt dann ein 30tägiges Nachchromieren in 3%iger Kaliumbichromatlösung vor, die täglich zu wechseln ist. Hierauf werden die Präparate 24 Stunden mit mehrfach gewechseltem Wasser ausgewaschen. Die Färbung erfolgte in der Weise, daß die Präparate 2 Tage bei 35° C in einer 10%igen Eisenalaunlösung gebeizt, hierauf einige Minuten mit bidestilliertem Wasser ausgewaschen und 24 Stunden mit Hämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbt wurden. Die anschließende Differenzierung erfolgte in abgestuften Eisenalaunlösungen (5%; 2,5%; 1%).

Trotz der durch die Alkoholfixierung bewirkten Artefaktbildung blieb ein Großteil der mikroskopisch dimensionierten Strukturen noch befriedigend erhalten. Im Plasma war eine mehr oder weniger beträchtliche Anzahl von stark gefärbten Grana zu erkennen. Diese Körnchen waren in frostgehärteten Präparaten insbesondere der Sorten *Criewener 192*, *Engelens Siegfried*, *Taca* und *Hauter's II* wesentlich größer und zahlreicher als in den Zellen der Gewächshauskontrollen, wo meist nur eine feine schwarze Punktierung zu erkennen war. Bei den Sorten *Lohmann's Weender 3* und *Marquardt II* waren die Unterschiede zwischen gehärtetem und ungehärtetem Material nicht so deutlich. Besonders in Präparaten von frostgehärtetem *Criewener 192* waren diese Körnchen oft zu schollenartigen Massen zusammengeballt und zeigten Bilder, die den von TONZIG geschilderten sehr ähnlich waren (s. TONZIG 1937, Abb. 1—31).

Aus solchen Ergebnissen an anderen Pflanzen zog TONZIG (1937, 1941) den Schluß, daß es sich bei der nach dieser Vorbehandlung noch anfärbbaren Substanz um Mucoproteide handle. TONZIG selbst hatte keinerlei Untersuchungen in bezug auf die Frosthärtung bzw. Frostresistenz angestellt. Wenn man sich seiner Ansicht anschließen würde, könnte das Versuchsergebnis bedeuten, daß in den Zellen frostgehärteter Pflanzen deutlich mehr Mucoproteide vorhanden wären als in den Zellen der ungehärteten Kontrollen.

*β) Toluidinblau.* TONZIG (1941) arbeitete auch mit Toluidinblau, das in der Cytologie u. a. ganz allgemein zur Kennzeichnung von Kohlenhydrat-Protein-Komplexen verwendet wird (z. B. OGUR u. ROSEN 1949, ERICKSON, SAX u. OGUR 1949). Es wurden daher Untersuchungen mit diesem Farbstoff durchgeführt.

Die wie oben gewonnenen und mit Alkohol fixierten Präparate kamen für 24 Stunden in eine 1%ige Lösung von Toluidinblau in 75%igem Aethanol. Zur Differenzierung diente hier 70%iges Aethanol.

In den Epidermiszellen zeigte sich praktisch derselbe Effekt wie bei der vorhergegangenen Hämatoxylinfärbung. Die gefärbten Grana waren über die Protoplasten verteilt, saßen aber jeweils gehäuft um den Kern und vor allem am Rande des fixierten Plasmas. — Die Zellkerne waren auch hier gut gefärbt.

Die Grana zeigten sich in allen Präparaten, doch waren die Unterschiede zwischen gehärtetem und ungehärtetem Material bei den untersuchten Sorten *Criewener 192* und *Hauter's II* sehr deutlich, nicht so bei den anderen verschieden frostharten Sorten in gehärtetem und ungehärtetem Zustande.

Schließlich versprachen Untersuchungen der Mesophyllzellen interessante Ergebnisse. Blattstückchen wurden daher 48 Stunden in Alkohol fixiert, über Methylbenzoat-Benzol in Paraffin eingebettet, mit 8 $\mu$ Dicke geschnitten, über Xylol in Wasser übergeführt, mit Diastaselösung behandelt, bis sich in den Kontrollen mit Jod-Jodkalium keine Stärke mehr nachweisen ließ, mit bidestilliertem Wasser gut ausgewaschen und dann, wie o. a. mit Toluidinblau gefärbt. Die so angefärbte Substanz zeigte sich besonders in den Chloroplasten als ganz feine Punktierung.

Diese Beobachtung ist vor allem im Hinblick auf die Feststellung von ULLRICH (1924) interessant, der nachweisen konnte, daß die Chloroplasten mit dem Eiweißstoffwechsel in enger Beziehung stehen und in gewissem Sinne als Eiweißspeicher fungieren können.

Es hatte den Anschein, als ob die Zellen des Mesophylls mehr von diesen fraglichen Substanzen („Mucoproteide" nach TONZIG) enthielten als die Epidermiszellen. Der Befund deckt sich somit mit dem auf anderem Wege erzielten Ergebnis von GAGETTI (1947). — Ein Unterschied zwischen frostgehärtetem und ungehärtetem Material war auch hier deutlich vorhanden.

*γ) Weitere Farbstoffe.* Im Anschluß an diese cytologisch-färbetechnischen Untersuchungen wurden solche noch mit einigen anderen Farbstoffen durchgeführt, die z. T. mehrfach schon von TONZIG erwähnt werden. TONZIG benutzte neben der Alkoholfixierung oft auch die Fixierungsflüssigkeit nach REGAUD. Deshalb wurden im folgenden mit beiden Fixierungsmitteln Versuche durchgeführt und zwar mit Kongorot, Anilinblau, Bismarckbraun und Mucicarmin in verschiedenen Konzentrationen und mit wechselnder Färbedauer. Das Ergebnis war in allen Fällen wesentlich unklarer als bei den Färbungen mit Toluidinblau und mit Hämatoxylin,

soweit sich dabei überhaupt ein positiver Befund ergab. Bei diesen Versuchen wurden in der Regel jeweils 10—15 Präparate untersucht.

Untersuchungen nach den Methoden von HOTCHKISS (1948) und MCMANUS (1948) mit Perjodat-Leukofuchsin verliefen ebenfalls negativ.

**b) Fermentative Analyse.** Eine Aufklärung über die stoffliche Natur dieser anfärbbaren Grana sollten fermentative Analysen ermöglichen.

*α) Pepsin.* TONZIG (1937, S. 319ff.) hatte bereits Pepsinverdauungen an seinen Präparaten durchgeführt und festgestellt, daß es sich bei den anfärbbaren Grana nicht um einfache Eiweißverbindungen handelt, die der Verdauung mit Pepsin unterworfen sind. Untersuchungen mit 0,5%iger Pepsinlösung in 1/10 n Salzsäure, die nach einer 24- bzw. 48stündigen Verdauung bei 37° C über Toluidinblau weiterbehandelt wurden, bestätigten dies.

*β) Ribonuclease.* Durch die Untersuchungen von OPARIN u. JEWERINOWA (1947) war ein günstiger Einfluß von Nucleinsäuren auf die Thermostabilität von Proteinen gefunden worden. Da der Bedeutung der Nucleo-Proteide für die Zelle in letzter Zeit ein steigendes Interesse entgegengebracht wird (vgl. u. a. CASPERSSON 1950) und nach KESSLER u. RUHLAND (1938) offenbar ein Zusammenhang zwischen Kälteresistenz und Ruheperiode besteht, war immerhin die Möglichkeit gegeben, daß es sich bei den in Frage stehenden Substanzen um solche Verbindungen handeln könnte. Darüber hinaus werden diese Nucleo-Proteide durch Toluidinblau ebenfalls gefärbt (u. a. OGUR u. ROSEN 1949). Da aber Pepsin außer Kohlenhydraten und anderen Substanzen auch Nuclein-Verbindungen nicht angreift, wurde eine Verdauung mit Nuclease durchgeführt.

Die mit Alkohol fixierten Präparate von frostgehärtetem *Criewener 192* und *Hauter's II* wurden bei 37° C in einer Fermentlösung verschieden lange Zeit (2, 6, 12, 24 Stunden) gehalten und dann wieder wie oben weiterbehandelt. Die Kontrollen lagen während der Versuchszeit in destilliertem Wasser.

Die Fermentlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 5 mg Ribonuclease (General Biochemicals) wurden in 5 ml einer mit Borax-Kaliumbiphosphat auf *pH* 8,5 gepufferten wäßrigen Lösung gelöst und eine Spur Magnesiumcarbonat zugesetzt. Diese Fermentlösung setzte die Viskosität einer hochviskosen wäßrigen Lösung von Heferibonucleinsäure (derselben Herkunft) nach einem $^1/_2$-stündigen Verweilen des Substrates bei 37° C deutlich herab, wodurch die Aktivität des Fermentes erwiesen war.

Es konnte kein Einfluß auf die in Frage stehende, färberisch darstellbare, körnige Substanz festgestellt werden. Auch durch eine der Ribonuclease-Behandlung vorgeschaltete Pepsinverdauung ließ sich die Anfärbbarkeit der Grana nicht aufheben, ebenso wie eine Variation der während der Verdauung herrschenden Temperatur (37°, 60°, 69°, 82° C) kein anderes Ergebnis brachte.

*γ) Perchlorsäure.* Anstelle der teuren Nuclease werden neuerdings in der Cytologie zum Nachweis von Nucleo-Proteiden verdünnte wäßrige Perchlorsäurelösungen verwendet. Nach ERICKSON, SAX u. OGUR (1949) ist eine kalte 10%ige Perchlorsäurelösung in ihrer Wirkung der Ribonuclease gleichzusetzen. Heiße Perchlorsäurelösung derselben Konzentration dagegen soll nach den genannten Autoren auch Desoxyribonucleinsäure angreifen und in Lösung bringen.

Die mit Alkohol fixierten Präparate von frostgehärtetem und ungehärtetem *Criewener 192* und *Hauter's II* wurden 8, 12 und 18 Stunden der Einwirkung einer 10%igen Perchlorsäurelösung bei 4° C ausgesetzt. Die Färbbarkeit mit Toluidinblau ging dabei verloren, nur die Kerne und die Zellwände nehmen sowohl bei gehärtetem als auch ungehärtetem Material noch Farbe an. Nach Behandlung mit 10%iger Perchlorsäurelösung bei 70° C war eine Anfärbung des Zellinhaltes überhaupt nicht mehr möglich.

Der Untersuchungsbefund deckt sich somit durchaus mit den Feststellungen von ATKINSON (1952). Der genannte Autor betont, daß Perchlorsäure nicht nur Ribonucleinsäure, sondern auch Mucopolysaccharide zerstört, was in unserem Zusammenhang auch sehr interessant ist. — Die Wirkung der Perchlorsäure ist somit für den Ribonucleinsäurenachweis, entgegen der Ansicht von ERICKSON, SAX u. OGUR (1949) und von FISCHER (1953) u. a. nicht spezifisch und daher auch für den Nachweis von Ribonucleinsäure nicht ohne weiteres geeignet.

*δ) Hyaluronidase.* Der nächste Schritt dieser fermentativen Untersuchungen war eine Behandlung mit dem als „Hyaluronidase" bezeichneten Fermentkomplex. Eine solche versprach vor allem deshalb interessant zu werden, weil ja — wie bereits des öfteren erwähnt — TONZIG (1937, 1941, 1942, 1947), FRANCINI (1937, 1938) und GAGETTI (1947) die Ansicht vertreten, daß es sich bei der fraglichen Substanz um „Muco-Proteide" handle.

Die Hyaluronidase ist ein Komplex aus mehreren miteinander vergesellschafteten Fermenten, deren Wirkungsweise noch nicht in allen Einzelheiten bekannt und zu übersehen ist (vgl. BERSIN 1951, BRÜGEL 1952). Benutzt wurde das Hyaluronidase-Präparat „*Luronase*" der Farbenfabriken Bayer (Leverkusen). Dieses baut (nach einer schriftlichen Mitteilung der Herstellerfirma vom 8. 12. 53) außer Hyaluronsäure sehr wahrscheinlich auch Chondroitinschwefelsäure fermentativ ab. „Weiterhin zerlegt es uronsäurehaltige, aber von Schwefelsäure freie Polysaccharide" (heißt es noch in diesem Briefe) — wodurch die Polysaccharidkomponenten der von TONZIG vermuteten „Muco-Proteide" miterfaßt werden sollten.

100 VRE[1] *Luronase* wurden zunächst mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und hierauf jeweils mit einem weiteren ml einer auf *pH* 4,7, *pH* 5,0 und *pH* 5,6 eingestellten Phosphatpuffer-Lösung vermengt. Die Präparate von *Criewener 192* und *Hauter's II* (gehärtet und ungehärtet) wurden in dieser Fermentlösung bis zu 24 Stunden bei

[1] VRE = Viskositäts-Reduktions-Einheiten.

verschiedenen Temperaturen (30° C, 60° C) gehalten und dann wie üblich über Toluidinblau weiterbehandelt. — Die Färbbarkeit der Grana mit Toluidinblau blieb erhalten.

Nach KULONEN (1950) sollen sich die bei der Hyaluronidase-Einwirkung freiwerdenden Substanzen mit Silbernitrat nachweisen lassen. Um dies zu prüfen, kamen die Präparate nach der fermentativen Behandlung für 20 bis 60 Minuten im Dunkeln in eine 5%ige ammoniakalische Silbernitratlösung, danach kurz in 5%ige Natriumthiosulfatlösung. Reduzierende Substanzen waren nach einer solchen Behandlung nicht nachzuweisen.

Das Ergebnis der Untersuchung war negativ. Es handelt sich also um eine Substanz, die dem Abbau durch den als „Hyaluronidase" bezeichneten Fermentkomplex nicht anheimfällt.

### *3. Untersuchungen über den Kohlenhydratgehalt von Plasmaeiweißsubstanzen*

Nach dem bisherigen Verlauf der Untersuchungen lag es nahe, festzustellen, ob überhaupt ein Unterschied bezüglich des Kohlenhydratgehaltes im Eiweiß von frostgehärtetem und ungehärtetem Material besteht.

Die mit Chloroform entfärbten Preßsäfte von kurz abgebrühten, dann zerkleinerten Blättern gehärteter und ungehärteter Pflanzen der zur Verfügung stehenden Sorten wurden nach aliquoter Verdünnung mit bidestilliertem Wasser zentrifugiert und die gelösten Eiweißanteile in der überstehenden, weitgehend geklärten Flüssigkeit mit Alkohol gefällt und filtriert. Um alle Stärke in lösliche Bestandteile überzuführen und diese dann auswaschen zu können, erfolgte eine Diastaseverdauung, bis der Rückstand keine Reaktion mit Jod-Jodkalium mehr ergab.

Zur Reinigung der Eiweißkörper von eventuell inkludierten Zuckern und beigemengten Membrananteilen erfolgte eine Umfällung und Auswaschung derselben nach der von TILLMANNS u. PHILIPPI (1929) gegebenen Vorschrift über NaOH und HCl.

Die Kohlenhydratbestimmungen an den auf solche Weise gereinigten Eiweißkörpern wurden teils mit *Anthron*, teils mit *Orcin* (BARRENSCHEEN u. VALYI-NAGY) durchgeführt. Die Orcintestungen hatten nur qualitativ orientierenden Charakter, wiesen aber in gleiche Richtung wie die folgenden Bestimmungen mit Anthron, das ja ein äußerst empfindliches Reagens auf Kohlenhydrate darstellt. Diese Bestimmungen erfolgten durch Suspendieren von 1 mg der zu prüfenden Substanz in 1 ml Wasser, dem 2 ml einer 0,2%igen Lösung von Anthron in konzentrierter Schwefelsäure zugesetzt wurde. Die Intensität der sich hierauf einstellenden Farbreaktion wurde nach 5 Minuten im Lange-Colorimeter bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Eiweißkomplexe aus gehärteten Pflanzen einen wesentlich höheren Kohlenhydratanteil besitzen als die

der ungehärteten Kontrollen. Nach Abklingen der Frosthärte, Anfang Mai, ging auch der Kohlenhydratgehalt des gehärteten Materials gegenüber den Winterwerten (Dezember/Januar) zurück. Aus dem prozentualen Anteil des Kohlenhydrats im Eiweißkomplex der einzelnen untersuchten Sorten auf deren relative Frostresistenz zu schließen, ist jedoch nicht möglich (Abb. 1).

Um einen Einblick zu gewinnen, welche KH im Spiele sein könnten, wurde eine Aufschwemmung des wie oben gewonnenen „Plasmaeiweißes" mit konz. Salzsäure versetzt, ein wenig Phloroglucin zugegeben und im Wasserbad erhitzt (s. KLEIN, Bd. 2, S. 806/07). Die

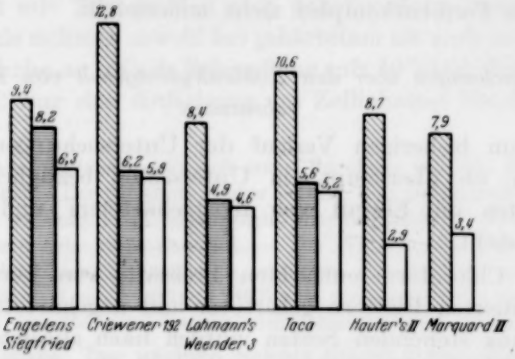


Abb. 1. Kohlenhydratgehalt der „Plasmaeiweißsubstanzen" (in Prozent des EW-Trockengewichts bezogen auf D-Ribose). ■ Freilandmaterial (Januar), ▤ Freilandmaterial (Mai), □ Gewächshausmaterial

im gehärteten Material der zur Verfügung stehenden Sorten auftretende violettrote Färbung ließ sich mit Amylalkohol ausschütteln und zeigte dasselbe spektroskopische Bild wie eine gleichartig behandelte wäßrige Lösung von D-Ribose. Demzufolge ist das Vorhandensein von Pentosen oder deren Polymeren anzunehmen.

Diese Reaktion war bei frostgehärtetem Material deutlich positiv, bei den Gewächshauskontrollen jedoch wesentlich schwächer und bei ungehärtetem *Hauter's II* und *Marquardt II* kaum erkennbar.

Untersuchungen auf Glucosamin an Preßsäften mit der Reaktion nach P. EHRLICH (zit. n. BRIGL u. PLOETZ 1951, S. 296) verliefen ebenso wie ein papierchromatographischer Test nach der von CRAMER (1952) gegebenen Vorschrift negativ.

### *4. Versuche mit Ribosegaben*

Nach dem positiven Ausfall der Phloroglucinreaktion sollte eine „Fütterung" der Pflanzen mit D-Ribose eine weitere Aufklärung über den in Frage stehenden Körper erbringen. H. ULLRICH (unveröffentlicht) konnte bereits früher feststellen, daß Epidermisstücke von *Allium cepa*, die eine Weile in Lösungen von D-Ribose gelegen hatten, bei nach-

Tabelle 1. *Kälteresistenz nach Ribose-Behandlung*
Die Pflanzen wurden verschieden lange bei verschiedener Temperatur gehalten

| Sorte und Temperatur | Lösung | Überlebende nach | | | Differenz in Prozent der auf Ribose bezogenen Werte nach 60 min |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 20 min | 40 min | 60 min | |
| Hauter's II | Ribose | 20 | 20 | 20 | etwa 15% |
| —3° C | Glucose | 19 | 19 | 17 | |
| Hauter's II | Ribose | 19 | 18 | 17 | etwa 30% |
| —5° C | Glucose | 18 | 13 | 11 | |
| Hauter's II | Ribose | 20 | 14 | 11 | etwa 40% |
| —8° C | Glucose | 18 | 10 | 3 | |
| Hauter's II | Ribose | 19 | 14 | 6 | 30% |
| —12° C | Glucose | 16 | 5 | 0 | |
| Criewener 192 | Ribose | 20 | 20 | 19 | 35% |
| —8° C | Glucose | 20 | 18 | 12 | |
| Criewener 192 | Ribose | 20 | 19 | 14 | 40% |
| —12° C | Glucose | 20 | 15 | 9 | |
| Taca | Ribose | 20 | 19 | 14 | 40% |
| —8° C | Glucose | 19 | 12 | 6 | |
| Taca | Ribose | 20 | 16 | 11 | 35% |
| —12° C | Glucose | 18 | 10 | 4 | |

folgender Kältebehandlung eine merklich gesteigerte Frostresistenz gegenüber den Kontrollen aufweisen.

Um die Frage nach möglicher Frostresistenzerhöhung durch Ribose-Fütterung zu prüfen, wurden Weizenkörner 48 Stunden in Wasser angequollen, dann in verschiedenmolaren Ribose-Lösungen angekeimt und die Keimpflanzen weitergezogen. Die Kontrollen befanden sich in entsprechend molaren Glucoselösungen. Damit war in beiden Lösungen derselbe osmotische Wert gewährleistet. Den Lösungen war eine Spur Thymol zugesetzt, was den Pflanzen nicht schadete, aber Bakterien- und Pilzbefall weitgehend verhinderte. In einem Kulturgefäß standen jeweils 10 Pflanzen. Nach 15 Tagen — die Pflanzen hatten inzwischen 2 Blätter ausgebildet — kamen die Gefäße für eine Stunde in einen jeweils auf eine bestimmte Temperatur einregulierten Bosch-Kühlschrank. Die eingestellte Temperatur schwankte in dem Schrank um $\pm 0{,}5°$ C.

Die Tabelle 1 zeigt die Versuchsergebnisse mit 1/10 molaren Lösungen. Es ist deutlich zu ersehen, daß die in der Ribose-Lösung gewachsenen Pflanzen eine merklich gesteigerte Kälteresistenz gegenüber den Kontrollen aufweisen.

*5. Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Frosthärtung*

Tumanow (1931) konnte zeigen, daß die Abhärtung der Pflanzen gegen Frost nur bei Licht erfolgt. Es sollte daher geprüft werden, ob

die Bildung der bei der Abhärtung im Plasma auftretenden Substanz lichtabhängig ist, oder ob es sich dabei um die Mitwirkung eines „Kälte- bzw. Wassereffekts" handelt, wie TONZIG (1941) vermutet.

Die Pflanzen wurden in Brunnenwasser gezogen, bis sie zwei Blätter ausgebildet hatten. Dann kamen sie zur Abhärtung für eine Woche bei 4° C in den Kühlschrank. Die Pflanzen der einen Versuchsreihe erhielten dabei eine täglich 8stündige Beleuchtung (OSRAM-Glühlampe b 23, 25 W) während die Pflanzen der anderen Reihe im Dunkeln gehalten wurden. Die Kontrollen verblieben bei ca. 15° C und ebenfalls 8stündiger Beleuchtung im Gewächshaus. Das Versuchsergebnis (Tab. 2) bestätigte durchaus die Befunde von TUMANOW (1931). Die während der Abhärtungsphase beleuchteten Pflanzen zeigten, nach dem oben beschriebenen Verfahren getestet, eine wesentlich gesteigerte Frostresistenz gegenüber den Dunkelkontrollen. In ihren Epidermiszellen waren nun aber die bekannten, mit Toluidinblau anfärbbaren Grana in größerer Anzahl vorhanden als in den Zellen der Dunkelkulturen und Gewächshauskontrollen.

Tabelle 2. *Lichteinfluß auf die Frosthärtung*
Die Pflanzen wurden verschieden lange bei verschiedener Temperatur gehalten

| Sorte und Temperatur | | Überlebende nach | | | Unterschied in Prozent nach 60 min |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 20 min | 40 min | 60 min | |
| Hauter's II | m. Licht | 20 | 20 | 19 | 50% |
| —3° C | o. Licht | 19 | 15 | 9 | |
| Criewener 192 | m. Licht | 20 | 20 | 20 | 35% |
| —3° C | o. Licht | 20 | 18 | 13 | |
| Engelens Siegfried | m. Licht | 20 | 20 | 20 | 30% |
| —3° C | o. Licht | 19 | 17 | 14 | |

### 6. *Untersuchungen über die Plasmaviskosität und deren Beeinflussung durch Pflanzenextrakte*

KESSLER (1935) und KESSLER u. RUHLAND (1938) haben festgestellt, daß sich mit steigender Frostresistenz die Viskosität des Plasmas erhöht. Sie konnten zeigen, daß sich die Plasmaviskosität, Permeabilität und Frosthärte durch verschiedene Substanzen (Heteroauxin, Blastokolingaben usw.) z. T. gegenteilig beeinflussen lassen. In diesem Zusammenhang verdienen auch die von STÅLFELT (1949) gefundenen, die Plasmaviskosität verändernden Wirkstoffe besondere Beachtung (vgl. auch STÅLFELT 1947).

Viskositätsbestimmungen an Zellen der Weizenpflanzen *(Criewener 192, Taca, Hauter's II)* waren schwierig. Die Plasmolyse-Zeit-Methode (WEBER 1929) brachte bei ungehärtetem Material in Rohrzuckerlösung durchaus brauchbare Ergebnisse. Bei frostgehärtetem Material jedoch

versagte diese Methode, da die Protoplasten starke Krampfplasmolyse zeigten und sich geradezu nur „widerwillig" und auch nur stellenweise unter Ausbildung zahlreicher, z. T. sehr starker HECHTscher Fäden von der Zellwand ablösten. Auch durch Zentrifugieren konnten keine klaren Ergebnisse erzielt werden. Soviel jedoch ist sicher, daß die Plasmaviskosität von Zellen gehärteter Pflanzen, nach dieser Methode beurteilt, wesentlich gesteigert ist gegenüber der ungehärteter Pflanzen. Eine erhöhte Viskosität der Preßsäfte frostgehärteter Pflanzen war auch schon bei der Abzentrifugierung des Preßsaftes und bei der Extraktion der Blattfarbstoffe deutlich bemerkbar. So war zur Sedimentation der

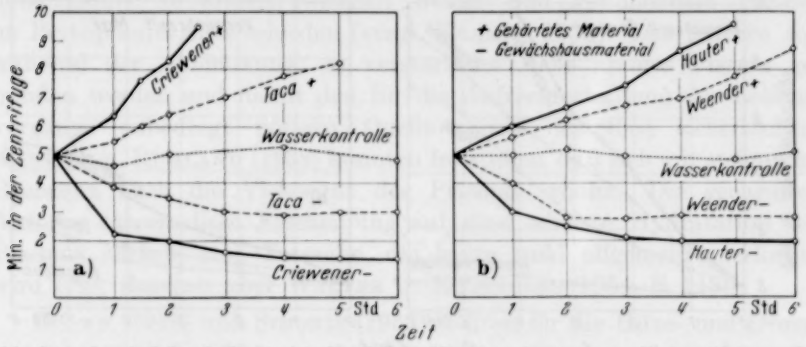


**Abb. 2 a u. b. Auf der Ordinate ist die Zeit in Minuten eingetragen, die benötigt wurde, um bei konstanter Umdrehung der Zentrifuge eine Protoplastenverlagerung zu bewirken, auf der Abszisse die Dauer (in Stunden) der Behandlung der *Helodea*-Zellen mit Weizenpflanzenextrakten**

gröberen Partikel im Preßsaft in der Zentrifuge bei gehärtetem Material immer eine längere Zentrifugierung nötig als bei ungehärtetem, und frostgehärtetes Material hielt seine Farbstoffe wesentlich fester als ungehärtetes, ohne daß sich eine saubere Ermittlung der Zeiten erzielen ließ. (Diese Erscheinungen waren übrigens bei allen zur Verfügung stehenden Winterweizensorten zu beobachten.)

Nunmehr sollte geprüft werden, ob Extrakte aus frostgehärteten und ungehärteten Pflanzen einen verschiedenen viskositätsverändernden Einfluß auf die Zellen von Testpflanzen *(Helodea canadensis)* besitzen. Gearbeitet wurde in Anlehnung an die von STÅLFELT gegebene Methode. 5 g Blätter (Frischgewicht) gehärteter Pflanzen wurden 30 Minuten lang mit 100 ml bidestilliertem Wasser bei 85° C extrahiert. Hierauf wurden Zellen von *Helodea canadensis* über verschieden lange Zeit in diese Extrakte gelegt und dann ihre Viskosität mit der Zentrifugenmethode bestimmt. *Helodea*-Kontrollen lagen während der Versuchszeit in bidestilliertem Wasser. Mit ungehärtetem Material wurde ebenso verfahren. Es zeigte sich, daß die Viskosität derjenigen *Helodea*-Zellen merklich erhöht war, die in Extrakten aus gehärtetem Material gelegen

hatten, während Extrakte aus ungehärtetem Material die Viskosität der Testzellen erniedrigten. Obwohl die Extrakte der verschiedenen Weizensorten die Viskosität der Testzellen verschieden stark beeinflußten, war auf diese Weise kein gradueller Unterschied ihrer Frosthärte zu erkennen (vgl. Abb. 2).

Dieses Versuchsergebnis veranlaßte mich zu prüfen, ob Extrakte aus frostgehärteten Pflanzen auch einen Einfluß auf die Plasmaviskosität ungehärteter Pflanzen zeigen.

Mit der Zentrifugiermethode wurde der Einfluß von Extrakten der frostgehärteten Sorten *Engelens Siegfried, Criewener 192* und *Taca*

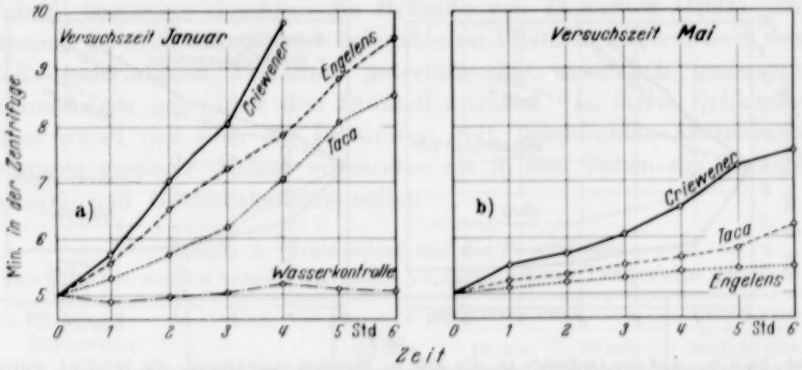


Abb. 3a u. b. Ordinate wie Abb. 2. Abszisse: Dauer der Behandlung von ungehärteten Marquardt II. — Epidermiszellen mit Extrakten aus gehärteten (a) bzw. ungehärteten (b) anderen Weizensorten

auf die Plasmaviskosität der Epidermiszellen von ungehärtetem *Marquardt II* festgestellt. Auch hier erhöhten Extrakte aus gehärteten Pflanzen die Viskosität und zwar im Zustand der „Vollresistenz" (Januar) in meßbar stärkerem Maße als nach Abklingen der Frosthärte (Anfang Mai) (vgl. Abb. 3).

## C. Besprechung der Ergebnisse

Jede durch „Frosthärtung" gewonnene Erhöhung der Kälteresistenz ist auf irgendwelche der verschiedenen Ursachen eines Kältetodes wirksam. Nach den bisherigen Erfahrungen wird man diese Ursachen in drei Gruppen einordnen können:

1. Durch Anwachsen von intrazellulären Eiskristallen wird bei wiederholtem Auftauen und Wiedergefrieren die Feinstruktur des Plasmas in steigendem Maße mechanisch zerrissen, bis schließlich das Plasma die entstandenen Schäden nicht mehr regenerieren kann (ULLRICH 1941); der Tod erfolgt als „Eistod".

2. Durch sinkende Temperatur werden in steigendem Maße fermentative Umsetzungen beeinflußt, bis nach Unterschreiten einer jeweils

spezifischen Temperatur und Überschreiten einer jeweils spezifischen Zeitdauer das Zusammenspiel der enzymatischen Vorgänge so stark gestört wird, daß keine Koordination mehr möglich ist und der „Tod" eintritt (Möbius 1907, Seible 1939, Spranger 1941, Kiermeier 1952).

3. Nach Unterschreiten der jeweils spezifischen Minimaltemperatur (Pfeffer 1904) wird das Plasma schließlich durch Entmischung seiner kolloidalen Bestandteile infolge zu weitgehenden Wasserentzuges irreversibel zerstört (Ullrich 1943).

In der Annahme, daß der Wassergehalt der Zellen, insbesonders der des Protoplasmas von entscheidender Bedeutung für die Frostresistenz ist, haben zahlreiche Autoren zwischen „freiem" und „gebundenem" Wasser im Protoplasma unterschieden (vergl. Kramer 1955). Das letztere soll während der „Abhärtung" in verstärktem Maße an das Plasma gebunden werden und damit den für die Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge unbedingt nötigen Quellungsgrad desselben sicherstellen. Kessler u. Ruhland (1938) konnten feststellen, daß sich mit steigender Resistenz auch die Viskosität des Plasmas erhöht. Die genannten Autoren führen diese Erscheinung auf eine erhöhte Hydratation des Plasmas zurück, eine Tatsache, die heute wohl allgemein anerkannt wird (vgl. dagegen aber Walter u. Ellenberg 1954, S. 213).

Bogen (1948) und Simonis (1952) stellten für die Hitze- und Dürreresistenz ähnliches fest, was in diesem Zusammenhang besonderes Interesse verdient.

Der kolloidale Zustand des Plasmas ist ja nicht stationär, vielmehr bedingen sich Struktur des Protoplasmas und physiologische Vorgänge gegenseitig und hängen z. T. auch von dem umgebenden Milieu ab (Markert 1955). So dürften heute wohl kaum Zweifel darüber bestehen, daß die verschieden frostharten Pflanzen auch ein verschieden starkes Wasserbindungsvermögen nicht nur osmotischer, sondern anderer Art besitzen (Ullrich 1943, vgl. auch Bogen 1953, Bogen u. Prell 1953, Bogen u. Follmann 1955 und Prell 1955).

Tonzig (1941), der das Vorkommen von Kohlenhydrat-Protein-Komplexen in pflanzlichen Zellen wahrscheinlich gemacht hat (1935, 1936, 1937, 1941), vertritt die Ansicht (1941), daß diese „composti muco-proteidi" für den Wasserhaushalt der Zellen allgemein von großer Bedeutung seien.

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen konnte durch die Anwendung der von Tonzig genannten Methoden durchaus derselbe Effekt erzielt werden, über den der genannte Autor mehrfach berichtet hat. In den Zellen frostgehärteter und ungehärteter Weizenpflanzen ließen sich sowohl mit Hämatoxylin als auch mit alkoholischer Toluidinblaulösung anfärbbare Grana nachweisen.

TONZIG glaubte auf Grund der Fixierung, Färbung und des negativen Ausfallens einer Pepsinverdauung an einen Kohlenhydrat-Protein-Komplex. Er ist der Ansicht, daß es sich bei dem Kohlenhydratanteil um ein Mucopolysaccharid handle. FRANCINI (1937, 1938) nahm als prosthetische Gruppe dieser „Muco-Proteidi" einen Schwefelsäureester eines Polysaccharides an.

Zunächst ließ sich durchaus in Übereinstimmung mit TONZIG zeigen, daß es sich bei der fraglichen Substanz um keine einfache Eiweißanhäufung handeln konnte, denn sie wurde durch Pepsin-Salzsäure nicht angegriffen. Auch mit Ribonuclease und Hyaluronidase zeigte sich kein Effekt. Ebenso kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit gesagt werden, daß es sich um keinen Polysaccharidschwefelsäureester handelt, was sich mit den Befunden CERUTIS (1941) deckt.

Der positive Ausfall der Behandlung mit Perchlorsäurelösungen weist in Übereinstimmung mit ATKINSON (1952) wohl nur auf das Vorhandensein eines Kohlenhydrat-Protein-Komplexes hin.

Da durch die cytologischen Untersuchungen keine vollständige Klärung hinsichtlich der chemischen Natur dieser anfärbbaren, als ausgefällte Mucoproteide aufgefaßten Grana erhalten werden konnte, wurden Pflanzenpreßsäfte zur Untersuchung herangezogen. Es zeigte sich, daß die daraus gewonnenen Eiweißfraktionen frostgehärteter Pflanzen einen größeren Kohlenhydratanteil besitzen als die der ungehärteten Kontrollen und daß die Kohlenhydratanteile bei Freilandpflanzen im Hochwinter (Dezember/Januar) deutlich höher waren als zu Anfang Mai (vgl. Abb. 1), zu einem Zeitpunkt also, zu dem die Frosthärte bereits wieder im Abklingen war.

Durch den positiven Ausfall der Phloroglucinprobe konnte ferner gezeigt werden, daß ein wesentlicher Anteil des im Plasma gehärteter Pflanzen vorhandenen Kohlenhydrates entweder direkt aus Pentosen besteht oder sich unter Beteiligung solcher aufbaut. Dieser Befund bestätigt durchaus die früheren Feststellungen von ROSA (1920, 1921) und HOOKER (1920). Diese Autoren konnten sowohl bei Anwendung niederer Temperaturen als auch bei Verringerung der Wassergaben eine Steigerung des Pentosangehaltes feststellen. Das ist auch von MACDOUGALS u. SPOEHR (1919) und von MACDOUGALS (1921) angegeben worden. — Schließlich deutet die schon von ULLRICH (unveröffentlicht) früher beobachtete und bei den vorliegenden Untersuchungen erneut festgestellte Erhöhung der Frostresistenz nach „Fütterung" der Pflanzen mit D-Ribose auf die Mitwirkung von Pentosen oder deren Polymeren.

TONZIG vertritt die Ansicht, daß die prosthetische Gruppe der „Muco-Proteidi" ein „Muco"-Polysaccharid sei. Nun ist die Nomenklatur der Kohlenhydrat-Protein-Komplexe durchaus nicht einheitlich (vgl. u. a. BERSIN 1951, S. 96, MEYER 1945, S. 249ff., und BLIX 1951,

S. 751 ff.). Wenn man annimmt, daß das im Eiweiß gehärteter Pflanzen vorhandene Kohlenhydrat an Polypeptiden besonders angereichert vorkommt — das Auftreten der Grana bei den cytologischen Untersuchungen bekräftigt dies — wird man sagen dürfen, daß bestimmte Eiweißkörper einen beträchtlichen Anteil der fraglichen Kohlenhydrate binden. Da die Prüfung auf Glucosamin negativ ausfiel, wird man nicht von Mucoproteiden sprechen können, sondern man wird die in Frage stehende Substanz zunächst ganz allgemein als Glykoproteid bezeichnen müssen. Weiteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, die Natur der Kohlenhydrat-Komponente vollends aufzuklären.

Die Frage, ob der Kohlenhydratanteil haupt- oder nebenvalenzartig an die Eiweiße gebunden ist, muß zunächst ebenfalls noch offenbleiben. Willstätter u. Rohdewald (1934) bezeichnen Verbindungen der zweiten Art als „Symplexe". Die Bildung solcher Symplexe ist stets an die Gegenwart bestimmter Atomgruppen geknüpft. So können z. B. Kohlenhydrate an die Guanido-Gruppen und an die OH-Gruppen der Proteine gebunden werden (Przylecki 1936). Rosenfeld u. Plyschewskaja (1954) konnten neuerdings in Modellversuchen verschiedene Komplexbildungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen feststellen, wobei fibrilläre Proteine sich als wirksamere Komplexbildner herausstellten als globuläre (vgl. dazu Ullrich 1936).

Solche Glykoproteide können auf Grund ihrer zahlreichen hydrophilen Gruppen Wasser recht fest an sich binden. Ullrich vertrat schon 1943 die Ansicht (S. 177), daß das im aktiven Zustand vorhandene „freie" Wasser wohl lediglich „auf Grund elektrostatischer adsorptiver Bindung als Quellungswasser im Plasma" festgelegt sei. Das im frostharten Zustand dagegen vorhandene „gebundene" Wasser dürfte „nach Art chemischer Haupt- und Nebenvalenzbindungen von den biogenen Substanzen festgehalten werden." Lehnartz (1952) betont ja u. a., daß eine feste chemische Bindung von Wasser an die Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten vorkommt. — Die Quellfähigkeit solcher Glykoproteide ist damit viel größer als die der reinen Eiweiße.

Da sich *in vivo* selbst mit dem Phasenkontrastmikroskop bis zur Grenze der mikroskopischen Auflösung keine wohlgeformten Körper feststellen ließen, diese vielmehr erst nach der weitgehenden Dehydratation des Plasmas durch Alkohol erkennbar wurden, läßt sich das Auftreten der Grana wohl am besten als Entmischungserscheinung durch Wasserentzug erklären.

Von Walker u. Yates (1952) wurde übrigens auch eine Gruppe von insbesonders UV-absorbierenden Substanzen in den Zellen nachgewiesen, die nicht zur eigentlichen Desoxyribonucleinsäure-Fraktion gehörten und höchstens ein wenig Ribonucleinsäure enthalten. Ob diese Substanzen mit den hier in Frage stehenden „Glykoproteiden" zu identifizieren sein könnten, ist ungeklärt. Es kann auch nicht ohne weiteres angenommen werden, daß die von Genevès (1953) bei 0° C beobachtete Bildung protoplasmatischer Einschlüsse bei *Allium cepa*-Zwiebelschuppen-Epidermen mit diesen Glykoproteiden in Zusammenhang stehen.

TUMANOW (1931) machte auf die Tatsache aufmerksam, daß der Abhärtungsvorgang der Pflanzen nur am Lichte abläuft. Neuerdings hat FUKUDA (1952) zeigen können, daß eine Korrelation zwischen Photoperiodismus, Temperatur und Ruheperiode bei Bäumen besteht und daß damit gewisse Umsteuerungen der Fermentwirkungen gekoppelt sind (vgl. auch OZOL u. LAZAREVA 1953, SIMINOVITCH, WILSON u. BRIGGS 1953, EWART, SIMINOVITCH u. BRIGGS 1953 und SIMINOVITCH u. BRIGGS 1954). Auch sind Anzeichen dafür vorhanden, daß gewisse photoperiodische Bedingungen für den Eintritt in die Abhärtungsphase gegeben sein müssen (RUDORF 1938, GUPALO 1950, DUŠEČKIN 1952, FEDEROV 1953, 1954).

Dies legt den Gedanken nahe, daß die erforderliche Mitwirkung des Lichtes bei der Abhärtung nicht allein in der etwa von ANDERSSON (1944) nachgewiesenen Zuckerproduktion besteht. Konnte doch festgestellt werden, daß sich die krautigen Pflanzen nur bei Licht abhärten und daß dabei eine deutliche Anhäufung der vermutlichen Glykoproteide in den Zellen zu beobachten ist. Es darf somit angenommen werden, daß diese Glykoproteide wohl irgendwie aus Zwischenprodukten der chemischen Abläufe bei der Photosynthese heraus sehr rasch in die biogene Substanz eingebaut werden. Die neuerliche Entdeckung von *Ribose* und *Ribulose* in der Gruppe der ersten Kohlenhydrate bei der Photosynthese könnte in diesem Sinne für eine Deutung herangezogen werden.

Seit LIDFORSS (1907) ist oft beobachtet worden, daß der osmotische Wert des Zellsaftes während der Härtung ansteigt. Diese Steigerung soll vor allem durch lösliche Kohlenhydrate (hauptsächlich Zucker) bewirkt werden (WALTER 1929, CONSTANTINESCU 1934, MUDRA 1933 u. a.). Bereits MÜLLER-THURGAU (1882) hatte einen Zusammenhang zwischen dem Zuckergehalt und der Frosthärte festgestellt. Andererseits kannte man aber schon, seit man sich mit diesen Fragen beschäftigte, Arten und Sorten, für welche die oft deutliche Beziehung zwischen der Kälteresistenz und der Konzentration des Zellsaftes nicht zutrafen (ÅRLAND 1931). LIDFORSS (1907) und nach ihm u. a. vor allem MAXIMOW (zuletzt 1951) sind der Ansicht, daß der während der Härtung in den Zellen angehäufte Zucker einer Denaturierung des Plasmaeiweißes wie ein sog. „Schutzkolloid" entgegenwirke. GASSNER u. GRIMME (1913), ÅKERMAN u. LINDBERG (1927), TUMANOW (1931) u. a. bestätigen diese Beziehung zwischen Zuckergehalt und Frostresistenz vor allem bei Winterweizen.

Nun hat aber bereits HARVEY (1918) gezeigt, daß die Frostresistenz bei der Abhärtung von Kohl z. B. schneller ansteigt als der Zuckergehalt; er hatte daher auf Grund dieser Befunde die dem Zucker zugesprochene Bedeutung als Kälteschutzagens abgelehnt. Besonders deutlich konnten ULMER (1937), KESSLER u. RUHLAND (1938) und PISEK (1950, 1952, 1953) auf solche Unstimmigkeiten zwischen Frostresistenz einerseits, Zuckerspiegel und osmotischem Wert andererseits hinweisen. PISEK hält alle diese Beobachtungen für Begleiterscheinungen der andersartig bewirkten Kälteresistenz und sagt (1952, S. 76): „Ein bestimmter Resistenzgrad kann also mit hohem oder tiefem Zuckerspiegel gepaart auftreten."

Die oft bei frostharten Pflanzen beobachtete Steigerung des osmotischen Wertes ihres Zellsaftes (Literatur bei WALTER 1951 und ANDERSSON 1944) läßt sich durch das Vorhandensein eines quellungsfähigen Symplexes, also beispielsweise Glykoproteiden, im Plasma verständlich machen. Der Quellungsdruck des Plasmas und der osmotische Wert des Zellsaftes müssen ja im Gleichgewicht zueinander stehen. Wenn die physiologischen Vorgänge nicht wesentlich gestört werden sollen, so muß einem erhöhten Quellungsdruck des in Frage stehenden Kohlenhydrats eine erhöhte Zellsaftkonzentration die Waage halten und eine zu starke Aufquellung des „Quellkörpers" verhindern, denn durch eine solche könnte die Feinstruktur des Plasmas zerstört werden.

Daß der ebenfalls während der Härtung sich bildende Zucker für die Frosthärtung eine Rolle spielt, hat neben der Erhöhung des osmotischen Wertes des Zellsaftes sicher noch andere Gründe. Schon KOVCHOFF (1907) hat beobachtet, daß die Aktivität eines proteolytischen Enzyms durch Zucker abgeschwächt wird und ANDERSSON (1944) glaubt, daß der Zucker eine Erhöhung der Quellbarkeit der Plasmakolloide bewirke. Er ist der Ansicht, daß um so mehr „gebundenes" Wasser vorhanden sei, je höher die Zuckerkonzentration ist.

Nimmt man an, daß schleimartige Substanzen das gesamte Plasma mehr oder weniger stark durchsetzen, so versteht man auch die mit einer solchen Zunahme der Glykoproteide einhergehende Erhöhung der Eisbeständigkeit des Protoplasmas. Wenn man sich diese schleimartigen Quellkörper als im Eiweißgerüst eingelagert denkt (vgl. die Modellversuche von ULLRICH 1941 und von ULLRICH u. VAN VEEN 1942), so wird dadurch die Eiskristallbildung (LUYET u. GEHENIO 1940) bei absinkender Temperatur hinausgezögert werden und zwar in Abhängigkeit von der relativen Konzentration und Verteilung dieser Körper. Die dadurch ermöglichten Unterkühlungen erreichen viel tiefere Temperaturen als sie durch eine Erhöhung der osmotischen Werte der Zellsäfte allein erzielt werden können.

Darüber hinaus wird auch durch solche „Quellkörper" die Diffusion von Wasser innerhalb des Protoplasmas vor allem in Richtung auf die Interzellularen wiederum in Abhängigkeit von der Konzentration dieser Substanzen verlangsamt und daher auch eine Eisbildung in den Interzellularen entsprechend verzögert werden.

KESSLER u. RUHLAND (1938) hatten festgestellt, daß das Plasma frostgehärteter Pflanzen eine erhöhte Viskosität gegenüber ungehärteten zeigt und daß sich die Viskosität ebenso wie die Frosthärte durch Wuchs- bzw. Hemmstoffgaben wechselseitig beeinflussen läßt (vgl. auch STÅLFELT 1947). — Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte ebenfalls eine erhöhte Viskosität im Plasma frostgehärteter Pflanzen

gegenüber den ungehärteten Kontrollen festgestellt werden. Weiterhin ließ sich die Plasmaviskosität ungehärteter Pflanzen durch Extrakte aus gehärteten Pflanzen erhöhen. Ob es sich bei diesen viskositätsverändernden Stoffen um Wuchs- bzw. Hemmstoffe handelt (vgl. z. B. LINSER 1940) oder um spezifische viskositätsverändernde Substanzen (vgl. STÅLFELT 1949), muß zunächst offenbleiben und durch weitere Experimente geklärt werden. MITCHELL u. MARTH (1950) konnten zeigen, daß wachstumsregulierende Stoffe in verschiedener Weise auf die Fähigkeit von Bohnenpflanzen wirken, Wasser verschieden stark festzuhalten. Auch ist durch verschiedene Hemmstoffgaben eine gesteigerte Frostresistenz erreicht worden (z. B. CORNS 1953, 1954, CRANE 1954, MODLIBOWSKA u. RUXTON 1954, SSAMYGIN 1954 u. a.).

Daß die bei der Abhärtung ablaufenden Vorgänge offenbar fermentativ gesteuert werden, ist schon gesagt worden. Die Anhäufung von freien Aminosäuren (SCHAFFNIT 1910, HARVEY 1918, SCHANDER u. SCHAFFNIT 1919) und löslichen Proteinen (WILHELM 1935, SEIBLE 1939, SIMINOVITCH u. BRIGGS 1949, 1954) weisen ebenso wie das Überhandnehmen von einfachen Kohlenhydraten auf eine Veränderung des Kohlenhydrat-Stickstoff-Gleichgewichts bei der Frosthärtung hin. STOKES (1953) beobachtete, daß bei Kälte der Proteinabbau aktiviert wird. LIDFORSS (1907) hat festgestellt, daß das Verhältnis Stärke:Zucker bei tiefen Temperaturen zugunsten der Zucker verschoben ist. SEIBLE (1939) und nach ihr SPRANGER (1941) haben ebenfalls enzymatische Störungen bei Kälteeinwirkung erkannt und dabei entsprechende Beobachtungen von WILHELM (1935) bestätigt. KIERMEIER (1952) weist darauf hin, daß für die Verschiebung des katalytischen Gleichgewichts in gefrorenen Pflanzengeweben zwei Ursachen maßgebend zu sein scheinen: 1. die Änderung des Reaktionsmilieus, wodurch „bei der außerordentlichen Empfindlichkeit der Enzyme gegenüber der Zusammensetzung des Substrats deren katalytische Aktivität ebenfalls einem Wechsel" unterliegt, und 2. bewirkt tiefe Temperatur auch eine Änderung des Enzymzustandes. Die Aktivität der Enzyme ist zudem in hohem Maße von der Aktivität des Wassers abhängig.

Es bestehen offenbar viele Ähnlichkeiten zwischen den bei der Kälte- und Dürrehärtung ablaufenden Vorgängen (s. u. a. SCHMIDT, DIWALD u. STOCKER 1940, STOCKER 1947, 1948, SIMONIS 1952, PISEK 1952, PISEK u. LARCHER 1954, MARKERT 1955). So konnten PISEK u. LARCHER (1954) zeigen, daß Austrocknungsresistenz und Frosthärte weitgehend parallel laufen, und sie führen beide Arten von Resistenz auf gemeinsame plasmatische Grundlagen zurück. Solches versuchten auch SERGEJEV u. LEBEDEV (1936), die für diese Resistenzarten den Begriff einer allgemeinen „Physiologischen Resistenz" vorschlagen. Ob auch bei den

Dürreresistenz-Effekten ähnlich wie bei denen der Kälteresistenz Glycoproteidschleime mitwirken könnten, sollte durch entsprechende Untersuchungen geprüft werden.

## Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorstehenden Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. In den Zellen der Epidermis und des Mesophylls verschiedener Sorten von Winterweizen lassen sich nach Alkoholfixierung sowohl mit Hämatoxylin als auch mit Toluidinblau anfärbbare Grana nachweisen. Diese Grana sind in den Zellen frostgehärteter Pflanzen stets zahlreicher als in den Zellen ungehärteter Kontrollen.

2. Diese anfärbbaren Grana werden durch Pepsin, Ribonuclease und Hyaluronidase nicht abgebaut, nach Einwirkung dünner Perchlorsäurelösungen sind sie aber nicht mehr darstellbar.

3. Das Eiweiß gehärteter Pflanzen zeigt einen deutlich höheren Kohlenhydratgehalt als das der ungehärteten Kontrollen. Das Eiweiß aus frostgehärteten Pflanzen wies eine positive Reaktion mit Phloroglucin auf, was auf die Anwesenheit von Pentosen bzw. Pentosanen schließen läßt. Glucosamin oder ein anderer Aminozucker konnte nicht nachgewiesen werden.

4. Eine Abhärtung der untersuchten Sorten erfolgt im allgemeinen nur bei Licht. So konnte festgestellt werden, daß sich die unter 1. genannte, mit Alkohol ausfällbare Grana bildende Substanz während der Härtung nur bei Belichtung der Pflanzen bildet. Füttert man die Pflanzen mit D-Ribose, so wird ihre Kälteresistenz gegenüber den Kontrollen erhöht.

5. Die Plasmaviskosität frostgehärteter Pflanzen war bei Untersuchung mit der Zentrifugiermethode in allen Fällen merklich höher als die der ungehärteten Kontrollen. Die Plasmaviskosität der Kontrollen ließ sich aber durch Extrakte aus gehärteten Pflanzen erhöhen.

6. Die an Eiweißkomponenten gebundenen KH ergaben keine Reaktion auf Glucosamin. Daher können die KH-Eiweißsubstanzen, die hier beobachtet wurden, wohl allgemein als Glykoproteide bezeichnet werden.

Abschließend werden einige theoretische Überlegungen angestellt, und es wird versucht, die Ergebnisse mit den seitherigen Erfahrungen über die bei der Frosthärtung ablaufenden Vorgänge in Einklang zu bringen.

Herrn Professor Dr. H. Ullrich gilt mein Dank für die Anregung zu dieser Arbeit und ihre stete Förderung. Herrn Professor Dr. A. Arnold danke ich für rege Anteilnahme und viele Ratschläge. — Für materielle Unterstützung bin ich zu

großem Dank verpflichtet: der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg; Herrn Professor Dr. H. BREDERECK, Stuttgart; den Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen; der Robert Bosch-GmbH, Stuttgart; dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (Direktor: Prof. Dr. BROUWER), Stuttgart-Hohenheim und Herrn Landwirt Eugen Baumann, Mittelbrüden, Krs. Backnang.

## Literatur

ÅKERMAN, Å., u. J. LINDBERG: Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen nebst Untersuchungen über die Winterfestigkeit des Weizens. Knut und Alice-Wallenberg-Stiftung, Bd. 10, S. 1—232. Lund 1927. — ANDERSSON, G.: Gas change and frost hardening in winter cereals, S. 1—163. Lund 1944. — ÅRLAND, Å.: Krankheitsbefall, Anfälligkeit, Pflanzenernährung und Winterfestigkeit in ihren Beziehungen untereinander und zur Transpiration. Arch. Pflanzenbau **7**, 79—125 (1931). — ATKINSON, W. B.: Differentiation of nucleic acids and acids mucopolysaccharides in histologic sections by selective extraction with acids. Science (Lancaster, Pa.) **116**, 303—305 (1952). — BARRENSCHEEN, H. K. u. T. VALYI-NAGY: Eine modifizierte Orcin-Reaktion zur Bestimmung kleinster Mengen von Pentosen, Nucleotiden und Glucuronsäuren. Z. Naturforsch. **4b**, 203—207 (1949). — BERSIN, TH.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig 1951. — BLIX, G.: Glykoproteide. Aus FLASCHENTRÄGER, Physiologische Chemie, Bd. I, S. 751—767. 1951. — BOBKO, E. W., u. R. A. POPOWA: Beiträge zur Frage über die Dürre- und Kälteresistenz der Pflanzen. I. Gebundenes Wasser in den nach der Kälteresistenz verschiedenen Weizensorten. Z. Pflanzenernährg **14**, 24—37 (1929). — BOGEN, H. J.: Untersuchungen über Hitzetod und Hitzeresistenz pflanzlicher Protoplaste. Planta (Berl.) **36**, 298—340 (1948). — Beiträge zur Physiologie der nichtosmotischen Wasseraufnahme. Planta (Berl.) **42**, 140 bis 153 (1953). — BOGEN, H. J., u. G. FOLLMANN: Osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme bei Diatomeen. Planta (Berl.) **45**, 125—146 (1955). — BOGEN, H. J., u. H. PRELL: Messung nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten. Planta (Berl.) **41**, 459—479 (1953). — BRIGL, P., u. TH. PLOETZ: Die Kohlenhydrate. Aus FLASCHENTRÄGER, Physiologische Chemie, Bd. I, S. 255 bis 359. 1951. — BRÜGEL, H.: Die Hyaluronidasen. Dtsch. med. Wschr. **1952**, 1415—1416. — CASPERSSON, T.: Cell growth and cell function. New York 1950. CERUTI, A.: Ricerche sulla cause chimiche e chimico-fisiche della metacromarsia del bleu di toluidina e sue applicazioni all'interpretazione dei costituenti nucleari. Arch. Botanico **16**, 37—113 (1941). — CONSTANTINESCU, E.: Weitere Beiträge zur Physiologie der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **21**, 304—323 (1934). — CORNS, W. G.: Improvement in frost resistance of parsuip tops sprayed with chemical growth substances. Science (Lancaster, Pa.) **118**, 281 (1953). — Improvement in low-temperature resistance of sugarbeet seedlings treated with dalapon (2,2-dichloropropionic acid). Science (Lancaster, Pa.) **120**, 346—347 (1954). — CRAMER, FR.: Papierchromatographie. Weinheim 1952. — CRANE, J. C.: The effectiveness of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in reducing drop and promoting growth of frosted apricot fruits. Science (Lancaster, Pa.) **119**, 383—385 (1954). — DEXTER, S. T.: Studies of the hardiness of plants: A modification of the NEWTON pressures method for small samples. Plant Physiol. **7**, 721—726 (1932). — Salt concentration and reversibility of ice formation as related to the hardiness of winterwheat. Plant. Physiol. **9**, 601—618, 831—837 (1934). — DOYLE, J., and PH. CLINCH: The dehydration rates of conifer leaves in relation to pentosan content. Sci. Proc. Roy. Dubl. Soc. **18**, 265—275 (1926). — DUŠEČKIN, V. I.: Über die die Winterhärte mehrjähriger Graspflanzen bestimmenden biologischen Ursachen. Ber. Akad. Wiss. USSR. **85** (1952). Zit. nach Ber. Biol. **82**, 257. — ERICKSON, R. O., K. B. SAX and

M. Ogur: Perchloric acid in the cytochemistry of pentose nucleic acid. Science (Lancaster, Pa.) **110**, 472—473 (1949). — Ewart, H. H., D. Siminovitch and D. R. Briggs: Amylase and phosphorylase systems of the bark tissues. Plant Physiol. **28**, 629—644 (1953). — Fedorov, A. K.: Zum Problem der Rolle des Herbstlichtes bei der Entwicklung der Winterpflanzen. Ber. Akad. Wiss. USSR. **93** (1953). Zit. nach Ber. Biol. **90**, 191. — Zum Problem der Rolle des Lichts bei der Anpassung der Pflanzen an Winterunbilden. Izv. Akad. Wiss. USSR., Ser. Biol. **1954**, Nr 5. Zit. nach Ber. Biol. **94**, 362. — Fisher, E. R.: The destruction of cytoplasmic basophilia with mineral acids. Stain Technol. **28**, 9—12 (1953). — Francini, E.: Il comportamento del nucleolo di Paphiopedilum Spicerianum di fronte a fissatori di tipo diverso. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **43**, 773—784 (1937). — A proposito del potere cromotropo del nucleolo. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **45**,, 558—566 (1938). — Fuchs, W., u. K. von Rosenstiel: Physiologische Resistenz. Aus Roemer-Rudorf, Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. 1. 1941. — Fukuda, Y.: Seasonal changes of the hydrature features of the Manchurian woody plants, especially on the reserve materials. J. Sci. Hiroshima, Ser. B **2**, 127—177 (1952). — Gagetti, A.: Lavori di Bot. **1947**. Zit. nach Fortschr. Bot. **13**, 223. — Gassner, G., u. C. Grimme: Beiträge zur Frage der Frosthärte der Getreidepflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **31**, 507—516 (1913). — Genevès, L.: Sur l'apparition temporaire d'abondantes inclusions paraplasmatiques dans les méristèmes radiculaires d'Allium cepa formés à 0° C puis réchauffés. C. r. Acad. Sci. Paris **236**, 1070—1072 (1953). — Göppert, H. R.: Über die Wärmeentwicklung in den Pflanzen, deren Gefrieren und die Schutzmittel gegen dasselbe. Breslau 1830. — Gupalo, P. J.: Über die Bedeutung der Aussaatzeiten des Winterweizens für seine Winterfestigkeit. Ber. Akad. Wiss. USSR. **74** (1950). Zit. nach Ber. Biol. **73**, 298. — Harvey, R. B.: Hardening process in plants and development from frost injury. J. Agricult. Res. **15**, 83—111 (1918). — Henkel, P. H.: Die Dürreresistenz der Pflanzen. Moskau 1946. Zit. nach Markert 1955. — Hooker 1920: Zit. nach Åkerman u. Lindberg (1927). — Hotchkiss, R. D.: A microchemical reaction resulting in the staining of the polysaccharide structures in fixed tissues preparations. Arch. of Biochem. **16**, 131—141 (1948). — Kessler, W.: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Planta (Berl.) **24**, 312—352 (1935). — Kessler, W., u. W. Ruhland: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **28**, 159 bis 204 (1938). — Kiermeier, F.: Über die Enzymaktivität in gefrorenen Pflanzengeweben. Naturwiss. **39**, 323—325 (1952). — Klein, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1931. — Kovchoff, J.: Enzymatische Eiweißzersetzung in erfrorenen Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **25**, 473—479 (1907). — Kramer, P. J.: Bound water. Aus Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I, S. 223—242. 1955. — Kulonen, E.: A histochemical method for determination of hyaluronic acid. Acta path. scand. (Københ.) **27**, 461—472 (1950). — Lehnartz, E.: Einführung in die chemische Physiologie. Berlin 1952. — Levitt, J.: The relation of cabbage hardiness to bound water, unfrozen water, and cell concentration when frozen. Plant Physiol. **14**, 93—112 (1939). — Levitt, J., and G. W. Scarth: Frost hardening studies with living cells. I. Osmotic and bound water changes in relation to frost resistance and the seasonal cycle. Canad. J. Res., Sect. C **14**, 267—284 (1936). — Lidforss, B.: Die wintergrüne Flora. Lunds Univ. Årsskr., N. F. **2**, 2 (1907). — Linser, H.: Über das Vorkommen von Hemmstoff in Pflanzenextrakten sowie über das Verhältnis von Wuchsstoffgehalt und Wuchsstoffabgabe bei Pflanzen oder Pflanzenteilen. Planta (Berl.) **31**, 32—59 (1940). — Long, W. A. de: Pentosan content in relation to winter hardiness in the apple. 1924. Zit. nach Åkerman u. Lindberg 1927. — Luyet, B. J., and P. M. Gehenio: Life and death at low temperature. Normandy-Missouri 1940. — MacDougal,

D. T.: Water deficit and the action of vitamines, aminocompounds, and salts on hydration. Amer. J. Bot. **8**, 296—302 (1921). — MACDOUGAL, D. T., and H. A. SPOEHR: The origination of xerophytism. Plant World **21**, 245—249 (1919). — MARKERT, S.: Untersuchungen über den Einfluß von Elektrolyten auf die Viskosität von pflanzlichen Solen. (Modellversuche über Beeinflussung der Plasmastruktur von Pflanzenzellen durch Düngemittel). Protoplasma (Wien) **45**, 37—54 (1955). — MAXIMOW, N. A.: Kurzes Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Berlin 1951. — MCMANUS, I. F. A.: Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain. Technol. **23**, 99—108 (1948). — MEYER, K.: Mucoids and Glycoproteins. Adv. Protein Chem. **2**, 249—275 (1945). — MITCHELL, I. W., and P. C. MARTH: Effect of growth-regulating substances on the water-retaining capacity of bean plants. Bot. Gaz. **112**, 70—76 (1950). — MODLIBOWSKA, I., and J. P. RUXTON: The effect of maleic hydrazide on the spring frost resistance of the malling exploit raspberry. J. Horticult. Sci. **29**, 184—191 (1954). — MÖBIUS, M.: Die Erkältung der Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **25**, 67—70 (1907). — MUDRA, A.: Zur Physiologie der Kälteresistenz des Winterweizens. Planta (Berl.) **18**, 435—478 (1933). — MÜLLER-THURGAU, H.: Über Zuckeranhäufung in Pflanzenteilen infolge niederer Temperaturen. Landwirtsch. Jb. **11**, 751—828 (1882). — NEWTON, R.: Colloidal properties of winter wheat plants in relation to frost resistance. J. Agricult. Sci. **14**, 178—191 (1924). — NEWTON, R., and W. R. BROWN: Seasonal changes in the composition of winter wheat plants, in relation to frost resistance. J. Agricult. Sci. **16**, 522—538 (1926). — OGUR, M., and G. ROSEN: Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid (DNA) and pentose nucleic acid (PNA) from plant tissues. Federat. Proc. **8**, 459 (1949). — OPARIN, A. J., u. T. N. JEWERINOWA: Der Einfluß der Nukleinsäure auf die Thermostabilität eines Proteins. Ber. Akad. Wiss. USSR. **58** (1947). Zit. nach Chem. Zbl. **1948**, 1324. — OZOL, A. M., u. A. A. LAZAREVA: Der Zustand der Triebgewebezellen während der Winterruhe und die Winterhärte der Nußbäume. Ber. Akad. Wiss. USSR. **89** (1953). Zit. nach Ber. Biol. **86**, 375. — PFEFFER, W.: Pflanzenphysiologie. Leipzig 1904. — PISEK, A.: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei Rhododendron ferrugineum, Pinus cembra und Picea excelsa. Protoplasma (Wien) **39**, 129—146 (1950). — Zur Kenntnis der Frosthärte alpiner Pflanzen. Naturwiss. **39**, 73—78 (1952). — Wie schützen sich die Pflanzen gegen Frost? Umschau **53**, 641—643 (1953). — PISEK, A., u. W. LARCHER: Zusammenhang zwischen Austrocknungsresistenz und Frosthärte bei Immergrünen. Protoplasma (Wien) **44**, 30—46 (1954). — PRELL, H.: Die Wasserbilanz plasmolysierter Protoplasten. Planta (Berl.) **46**, 272—285 (1955). — PRZYLECKI, S., K. KASPRZYK u. H. RAFALOWSKA: Untersuchungen über Polysaccharoproteide. X. Rolle der einzelnen Aminosäurereste und Schlußbetrachtungen. Biochem. Z. **286**, 360—372 (1936). — ROSA, J. T.: Pentosan content in relation to hardiness of vegetable plants. Proc. Amer. Soc. Horticult. Sci. **1920**, 207—210. — Investigations on the hardening process in vegetable plants. Miss. Agric. Exper. Stat. Res. Bull. **48** (1921). Zit. nach ANDERSSON 1944. — ROSENFELD, JE. L., i JE. G. PLYSCHEWSKAJA: Der Einfluß der Struktur verschiedener Polysaccharide pflanzlicher und tierischer Herkunft auf ihre Fähigkeit, mit Proteinen Komplexe zu bilden. Biochimia **19**, 161—166 (1954). Zit. nach Chem. Zbl. **1955**, 3397. — RUDORF, W.: Keimstimmung und Photoperiode in ihrer Bedeutung für die Kälteresistenz. Züchter **10**, 238—246 (1938). — SCHAFFNIT, E.: Studien über den Einfluß niederer Temperaturen auf die pflanzliche Zelle. Mitt. Kaiser-Wilhelm-Inst. Landwirtsch. **3**, 93—144 (1910). — SCHANDER, R., u. E. SCHAFFNIT: Untersuchungen über das Auswintern des Getreides. Landwirtsch. Jb. **52**, 1—66 (1919). — SCHMIDT, H., K. DIWALD u. O. STOCKER: Plasmatische Untersuchungen an dürreempfindlichen und dürreresistenten Sorten landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Planta (Berl.) **31**, 559—596 (1940). — SEIBLE, D.:

Ein Beitrag zur Frage der Kälteschäden an Pflanzen bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt. Beitr. Biol. Pflanz. **26**, 289—330 (1939). — SERGEJEV, L. I., u. A. M. LEBEDEV: Beiträge zu einer physiologischen Resistenztheorie der Kulturgräser. Planta (Berl.) **25**, 84—103 (1936). — SIMINOVITCH, D., and D. R. BRIGGS: The Chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. I. Seasonal variations in protein content. Arch. of Biochem. **23**, 8—17 (1949). — Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. VII. A possible direct effect of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. Plant Physiol. **29**, 331—337 (1954). — SIMINOVITCH, D., C. M. WILSON and D. R. BRIGGS: Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. V. Seasonal transformations and variations in the carbohydrates: starch-sucrose interconversions. Plant Physiol. **28**, 383—400 (1953). — SIMONIS, W.: Untersuchungen zum Dürreeffekt. I. Morphologische Struktur, Wasserhaushalt, Atmung und Photosynthese feucht und trocken gezogener Pflanzen. Planta (Berl.) **40**, 313—332 (1952). — SPRANGER, E.: Das Erfrieren der Pflanzen über 0° mit besonderer Berücksichtigung der Warmhauspflanzen. Gartenbauwiss. **16**, 90—128 (1941). — SSAMYGIN, G. A.: Der Einfluß von Maleinsäurehydrazid auf den Wuchs und die Frostfestigkeit von Citronensämlingen. Ber. Akad. Wiss. USSR. **95** (1954). Zit. nach Chem. Zbl. **1955**, 2930—2931. — STÅLFELT, M. G.: Effect of heteroauxin and colchicine on protoplasmatic viscosity. Proc. of the 6. Internat. Congr. of Exper. Cyt., Stockholm, S. 63. 1947. — The lability of the protoplasmatic viscosity. Physiol. Plantarum (Copenh.) **2**, 341—349 (1949). — STOCKER, O.: Probleme der pflanzlichen Dürreresistenz. Naturwiss. **34**, 362—371 (1947). — Beiträge zu einer Theorie der Dürreresistenz. Planta (Berl.) **35**, 445—466 (1948). — STOKES, P.: The stimulation of growth by low temperature in embryos of Heracleum sphondylium L. J. of Exper. Bot. **4**, 222—234 (1953). — TILLMANNS, J., u. K. PHILIPPI: Über den Gehalt der wichtigsten Proteine der Nahrungsmittel an Kohlehydrat und über ein colorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstofffreiem Zucker im Eiweiß. Biochem. Z. **215**, 36—60 (1929). TONZIG, S.: Processi evolutivi in cellule e in tessuti a rapido ciclo vitale. I. Osservazioni morfologiche sopra gli apparati fiorali. 1935/36. — Osservazioni sopra la biologia degli apparati fiorali. Ann. di Bot. **21**, 117—152, 215—277 (1936). — Sopra la Presenza di composti Muco-Proteidi nel Condrioma, nel Nuclo e nel Citoplasma delle Cellule vegetali. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **44**, 312—323 (1937). — I mucoproteidi e la vita della cellula vegetale. — Saggio di una citofisiologia dell'acqua. Padua 1941. — Fenomeni di Regressione Cellulare Piante Succulente. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **49**, 1—10 (1942). — TONZIG, S., e C. TRECCANI-POMA: Studi sull'azione delle sostanze di crescita sopra il plasma vegetale. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **53**, 601—633 (1947). — TUMANOW, J. J.: Das Abhärten winteranueller Pflanzen gegen niedrige Temperaturen. Phytopath. Z. **3**, 303—332 (1931). — ULLRICH, H.: Die Rolle der Chloroplasten bei der Eiweißbildung in den grünen Pflanzen. Z. Bot. **16**, 513—562 (1924). — Einige Beobachtungen über Doppelbrechung am lebenden Protoplasten, an verschiedenen Zellorganellen sowie der Zellwand. Planta (Berl.) **26**, 311—318 (1936). — Über Strukturänderungen beim Gefrieren von Gelen. Kolloid-Z. **96**, 348—353 (1941). — Biologische Kältewirkung und plasmatische Frostresistenz. Protoplasma (Berl.) **38**, 165—183 (1943). — Kältefragen in der Pflanzen-Physiologie. Zur physiologischen Grundlagenforschung pflanzlicher Kälte- und Frostschäden. Klin. Wschr. **1944**, 189—192. — ULLRICH, H., u. P. VAN VEEN: Weitere Untersuchungen über das Ausfrieren von Kolloiden und Kolloidgemischen im Hinblick auf die plasmatische Frostresistenzforschung an Pflanzen. Kolloid-Z. **100**, 388—400 (1942). — ULMER, W.: Über den Jahresgang der Frosthärte einiger immergrüner Arten der

alpinen Stufe sowie der Zirbe und Fichte. Jb. wiss. Bot. **84**, 553—592 (1937). — WALKER, P. M. B., and H. B. YATES: Symposia Soc. Exper. Biol. **6** (1952). Zit. nach Fortschr. Bot. **15**. — WALTER, H.: Die osmotischen Werte und die Kälteschäden unserer wintergrünen Pflanzen während der Winterperiode. Ber. dtsch. bot. Ges. **47**, 338—348 (1929). — Grundlagen der Pflanzenverbreitung. Teil 1: Standortlehre. Stuttgart 1951. — WALTER, H., u. H. ELLENBERG: Ökologische Pflanzengeographie. Fortschr. Bot. **16**, 204—240 (1954). — WEBER, F.: Plasmolyse-Zeit-Methode. Protoplasma (Berl.) **5**, 622—624 (1929). — WILHELM, A. F.: Untersuchungen über die Kälteresistenz winterfester Kulturpflanzen, unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Mineralsalzernährung und des Stickstoff-Stoffwechsels. Phytopath. Z. **8**, 111—156 (1935). — Untersuchungen über das Verhalten sogenannter nicht eisbeständiger Kulturpflanzen bei niederen Temperaturen, unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Mineralsalzernährung und des N-Stoffwechsels. Phytopath. Z. **8**, 337 (1935). — WILLSTÄTTER, R., u. M. ROHDEWALD: Über den Zustand des Glykogens in der Leber, im Muskel und in Leukocyten. (Zur Kenntnis der Proteinbindung physiologisch wichtiger Stoffe.) Z. physiol. Chem. **225**, 103—124 (1934).

Dr. K. JEREMIAS, Botanisches Institut der T. H., Stuttgart

Planta, Bd. 47, S. 105—114 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

# ÜBER VERJÜNGUNG BEI HEDERA HELIX L.

Von

HANNS FRANK und OTTO RENNER

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 1. Dezember 1955)*

Im Rahmen einer Dissertation des jüngeren Autors (F.) über selbstgewählte Fragen des Alterns der Pflanzen[1] schlug der ältere Autor (R.) vor, auch die Determination der Altersform beim Efeu und der Seitenzweige von *Araucaria excelsa* zu untersuchen. Araucaria erwies sich als sehr schwer zu kultivieren, doch werden die Versuche fortgeführt (F.). Beim Efeu war ein experimentelles Ergebnis so überraschend, daß wir Bedenken trugen, es vor einer Vermehrung des Beobachtungsmaterials im Druck bekanntzugeben. Da nun eine gewisse Bestätigung von anderer Seite erfolgt ist (DOORENBOS 1954), stehen wir nicht an, die in der (maschinengeschriebenen) Dissertation vor zwei Jahren niedergelegten Befunde zu veröffentlichen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, Herrn E. KRAUSE für Hilfe beim Photographieren.

Die heteroblastische Entwicklung unseres Efeus durchläuft, wie die anderer Arten der Gattung *Hedera*, zwei tief verschiedene Phasen. Die Jugendform ist durch dorsiventrale, mit Wurzeln kriechende oder kletternde Sprosse gekennzeichnet, die zwei Zeilen gelappter Blätter tragen; die blühbare Folge- oder Altersform durch orthotrope, radiäre, im Freien nie und im Gewächshaus nur gelegentlich Haftwurzeln bildende Zweige mit spitz-eiförmigen, schraubig (in etwa $^2/_5$-Stellung) angeordneten Blättern. Das Auffallendste an diesem Gestaltwandel ist die Festigkeit, mit der die Charaktere der Folgeform determiniert erscheinen. Spontane Rückschläge zur juvenilen Gestaltung sind selten, und sogar Stecklinge aus der Krone blühbarer Sträucher wachsen zu radiären Bäumchen mit lauter einfachen Blättern heran (var. *arborescens* Loud. oder var. *arborea* der Gärtner).

Die Unterschiede der beiden Formen sind schon mehrfach eingehend beschrieben worden. Besonders TOBLER geht in seiner Monographie der Gattung Hedera 1912 genauer darauf ein. Die anatomischen Verhältnisse vergleichen FURLANI 1914 und KRANZ 1931. Über die Ausbildung der Sproßachse und der Haftwurzeln berichten BUCHENAU 1864, BRUHN 1910 und ebenfalls FURLANI 1914. Der letztgenannte

[1] Veröffentlicht ist davon: H. FRANK, Über den Stickstoffverlust bei alternden Pflanzen. Planta (Berl.) **44**, 319—340 (1954).

Autor hat auch den Wasserhaushalt der beiden Modifikationen untersucht. WEISSE 1924 und 1925 zeigt genau die Blattstellungsverhältnisse auf.

Zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Altersform auftritt, hängt zweifellos weitgehend von äußeren Faktoren ab, doch ist nach TOBLER (1912, S. 27) sicherlich mindestens ein Alter von etwa 10 Jahren in unseren Breiten erforderlich. So konnte im Sommer 1951 bei einem Stock, der eine Steinfigur an der Nordseite des Botanischen Institutes in München umspann, noch kein einziges Blatt der Altersform gefunden werden; die gleiche Pflanze bildete in der nächsten Vegetationsperiode erstmalig eiförmige Blätter und an diesen neuen Sproßteilen im Sommer auch Blüten, die sich im September normal öffneten. Das Alter dieser Pflanze betrug zu dieser Zeit 13 Jahre.

GOEBEL (1908, S. 81), MOLISCH (1920, S. 249), BAUR (1930, S. 57) u. a. berichten von *Rückschlägen* der Altersform in die Jugendform. GOEBEL hielt es für wahrscheinlich, daß relative Verminderung organischer Substanzen und relative Vermehrung der Aschenbestandteile für den Rückschlag maßgebend seien. BRUHN und KRANZ versuchten die in der Natur gelegentlich vorkommende Erscheinung im Experiment zu reproduzieren. KRANZ ging dabei von der Annahme FURLANIS aus, daß verschiedene Feuchtigkeitsgrade der Luft und des Bodens für die Modifizierung den Ausschlag gäben, kam aber zu dem Ergebnis, daß für die Blattform lediglich das Alter bestimmend sei, erstens der betreffenden Pflanze und zweitens des Ortes der Knospe; die spontanen Rückschläge deutet er als Austriebe schlafender Augen. BRUHN, der die Vermutung GOEBELS prüfen sollte, verdunkelte dekapitierte Sprosse für einige Zeit und brachte sie dann im feuchten Raum zum Austreiben. Dazu berichtet er: „Aus den Blattachselknospen entwickelten sich bei einigen Stecklingen.... kleine Triebe, deren Blätter nicht mehr eiförmig zugespitzt, sondern lappig waren und den jungen dorsiventraler Sprosse auffallend glichen. Leider gelang es mir nicht, die jungen Sprosse weiter zu kultivieren, um an ihnen auch noch die Änderung der $^2/_5$-Blattstellung, wodurch der Versuch erst völlig beweiskräftig ist, herbeizuführen."

*Vollkommene Rückschläge* an radiären Zweigen, die durch Abschneiden der Spitzenteile zum Austreiben von Achselknospen veranlaßt worden waren, konnten im Herbst 1953 an sehr alten Stöcken in Nymphenburg beobachtet werden. Diese wurden im Frühjahr um die Fenster des Instituts herum zurückgeschnitten und bildeten im Laufe des Sommers bis zu 70 cm lange Triebe aus, die in der Blattgestalt fast, und in der Blattstellung völlig der Jugendform glichen. Schon vorher hatten wir versucht, auf verschiedene Weise an *Stecklingspflanzen* die Rückkehr zum Jugendzustand zu erzwingen.

Die Bewurzelung der Stecklinge von der Altersform bereitete große Schwierigkeiten. In den Jahren 1951—1953 wurden mehrfach zu verschiedenen Jahreszeiten

Stecklingsserien geschnitten und unter verschiedenen Bedingungen zur Bewurzelung gebracht. Als günstigste Schnittzeit erwiesen sich die Monate Januar und Februar. Die gefrorenen Reiser wurden etwa 6 Stunden in 25—30° C warmes Wasser gelegt und dann, sehr dicht in sandige Erde gesteckt, im Schwitzkasten für drei Monate belassen. Es bewurzelten sich auf diese Weise maximal 14%. Das Baden der Reiser in Belvitan-Lösung von Bayer oder das Bestreichen mit Heteroauxinpaste erhöhte die Bewurzelungsrate nicht. Die Jugendform ist ihrer Lebensweise entsprechend immer zur Wurzelbildung bereit.

Es wurden stets Stecklinge der typischen Form von *Hedera helix* L. verwendet bis auf eine Ausnahme bei den Wasserkulturversuchen. Die Reiser der Serie V (vgl. S. 111) stammten nämlich von einer in der Altersform schmalblättrigen Variante, die der in Nordschottland häufigen gleicht.

### 1. Behandlung mit β-Indolylessigsäure (IES)

Je 10 Stecklinge der Altersform wurden an der Spitzenknospe mit einer frisch bereiteten Heteroauxinpaste (IES-Lösung und Wollfett 1:1) bestrichen. Die für diese Untersuchungen verwendeten Konzentrationen waren: $10^{-3}$, $10^{-4}$ und $10^{-5}$ molar IES. Um die Aufnahme des Wuchsstoffes zu erleichtern, wurden die Pflanzen täglich mit etwas Wasser besprüht. Soweit diese behandelten Knospen überhaupt austrieben, zeigten sie nach etwa drei Monaten, nachdem sie durchschnittlich 8—10 neue Blätter gebildet hatten, keinen Unterschied gegenüber der ursprünglichen Form.

### 2. Begasung mit Blausäure (HCN)

Gut bewurzelte Stecklinge wurden in einem abgeschlossenen emaillierten Metalleimer 1 Stunde, 2 und 3 Stunden einer Blausäureatmosphäre ausgesetzt. Für jedes Zeitintervall wurden drei Pflanzen verwendet. Die 1 Std lang begasten und zwei der 2 Std lang behandelten zeigten nach sehr kurzer Zeit Austriebe an der Spitzenknospe und an einigen Blattachselknospen, die in Gestalt und Stellung der Blätter völlig der Altersform glichen. Auch nach einem Jahr war bei diesen Exemplaren kein Rückschlag erfolgt. Die übrigen Pflanzen gingen nach wenigen Wochen ein.

Bei beiden Versuchsreihen, mit IES und mit Blausäure, wurden als Kontrolle stets 10 gut wachsende Jugendsprosse parallel behandelt, an denen natürlich keine Änderung der Wuchsform eintrat.

### 3. Kälteschock

14 gut entwickelte Stecklinge der Altersform (A) und 4 Kontrollen der Jugendform (J) wurden aus einem Treibkasten im Freiland im Juni 1952 in einen Kompressionskühlschrank gebracht. Die Temperatur betrug am Versuchstage im Kasten +30° C, im Kühlschrank —10°; die Expositionszeiten waren: 2 A und 1 J 1 Std; 6 A und 1 J 3 Std; 4 A und 1 J 4 Std; 2 A und 1 J $4^1/_2$ Std. Anschließend an den Aufenthalt in der Kälte wurden die Triebe wieder in den Kasten im Freiland zurückgestellt.

Nach einigen Tagen begannen die Blätter teilweise braun zu werden und zu vertrocknen. Nur an den 1 Std exponierten Pflanzen waren bis auf die jüngsten, noch nicht voll entwickelten Blätter alle unversehrt.

In diesem schwer geschädigten Zustand blieben die Stecklinge nun etwa sieben Tage stehen. Dann begannen einzelne Spitzenknospen und auch einige Achselknospen, die ganz basal gelegen waren, auszutreiben. Der Austrieb ging nicht langsamer vor sich als bei Stecklingen, die zur Kontrolle mechanisch aller Blätter beraubt worden waren. Zwei Monate nach dem Kälteschock hatten alle Pflanzen ausgetrieben, bis auf die beiden $4^1/_2$ Std exponiert gewesenen; sie waren abgestorben. Die neuen Triebe der 3 und 4 Std gekühlten Stecklinge waren alle in ihrer Blatt-

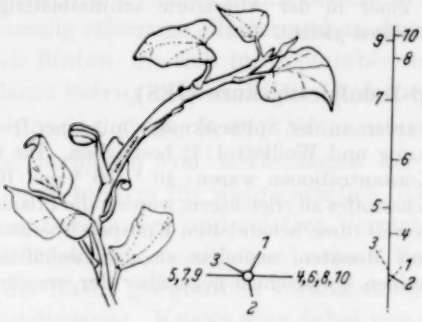


Abb. 1.

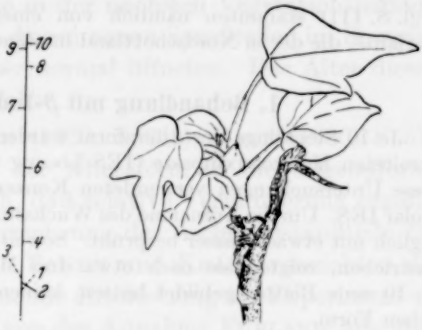


Abb. 2.

Abb. 1. Austrieb eines Zweiges der Altersform nach dreistündigem Kälteschock, mit Haftwurzeln, 4 Monate alt. Schema zur Änderung der Blattstellung

Abb. 2. Austrieb eines Zweiges der Folgeform 4 Monate nach Röntgenbestrahlung mit 2500 rl. Die Spitzenknospe rechts ist abgestorben

gestalt typisch „jugendlich"; die Blätter gingen von der schraubigen Stellung, wie sie in der Knospe angelegt war, zu 2-zeiliger über (Abb. 1). Die Kontrollen, denen die Blätter abgeschnitten worden waren, die gekühlten Jugendtriebe und die nur 1 Std exponierten Pflanzen zeigten keinerlei Veränderungen.

Durch die Einwirkung der Kälte wird also eine Umstimmung in der Pflanze bewirkt, die sich zunächst in einer Abänderung der Blattgestalt, aber dann auch in der Blattstellung äußert.

### 4. Röntgenbestrahlung

Acht Altersstecklinge und zur Kontrolle 2 der Jugendform wurden im August 1952 mit einem Röntgentherapiegerät bestrahlt, und zwar nur die Spitzenknospen. Die Bedingungen waren konstant folgende: Röhrenbelastung 60 kV, Abstand Focus-Objekt 2 cm, 2500 rl, kein Filter.

Nach der Bestrahlung kam das Wachstum der Pflanzen für etwa 4 Wochen völlig zum Stillstand. Nach dieser Zeit begannen 7 der 8 Pflanzen auszutreiben. Bei zwei Exemplaren waren die Spitzenknospen so nachhaltig geschädigt, daß sie vertrockneten; dafür trieb

aber die nächste, bzw. übernächste basalwärts gelegene Achselknospe aus (Abb. 2). Das Wachstum ging sehr langsam voran; gegenüber nicht bestrahlten Pflanzen blieben die Versuchspflanzen weit zurück. Nach 7 Monaten war nicht nur die Form der Blätter, sondern auch ihre Stellung die der normalen Jugendform (Abb. 3).

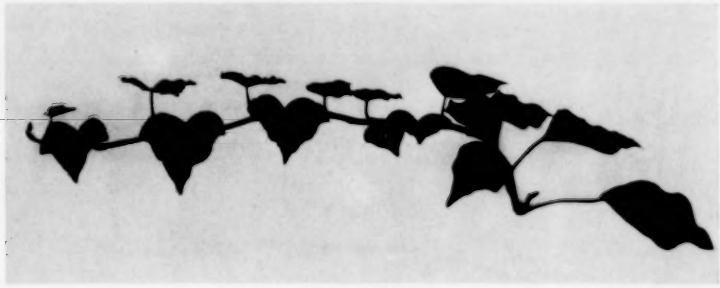

Abb. 3. Alterszweig 7 Monate nach Röntgenbestrahlung. Rückschlag in Blattform und -stellung

## 5. Wasserkulturen

Die Fragestellung bei den Wasserkulturen war: beeinflußt eine Form die andere in irgendeiner sichtbaren Weise? Wenn ja, welche Form beeinflußt die andere?

Als Nährlösung diente die von V. D. CRONE angegebene mit 1 ml HOAGLANDS A-Z-Lösung pro Liter. Die Kulturgläser faßten 1 Liter.

Es wurden 5 Serien von 10—20 Gläsern mit je einem Jugend- und einem Altersreis und jeweils 4 bis 10 Gläser mit je zwei Altersreisern besetzt. Die Serien wurden zu verschiedenen Jahreszeiten begonnen, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist. Serie II kam zur Kontrolle nicht in V. D. CRONE, sondern in KNOPsche Nährlösung. Das Nachfüllen der Gefäße geschah nach Bedarf mit Bachwasser. Vier Serien wurden im Gewächshaus aufgestellt; Nr. IV dagegen kam in einen schwach geheizten Schwitzkasten.

Die Altersreiser, die mit einem Jugendtrieb auf einem Glas beisammen waren, schlugen in die Jugendform zurück, wenn sie neu austrieben und Wurzeln bildeten. Wurde der Trieb groß genug, bevor er abstarb oder zu kümmern begann — was in vielen Fällen nach 2—3 Monaten eintrat —, dann ging er von der $^2/_5$-Blattstellung in die $^1/_2$-Stellung über und bildete Haftwurzeln aus (Abb. 4). Waren zwei Jugendtriebe (nur im Vorversuch) oder zwei Alterstriebe (Kontrolle bei jeder Serie) in einem Gefäß beisammen, so fand keine Veränderung der neuen Austriebe gegenüber der ursprünglichen Form statt (Abb. 5).

Von $14 + 10 + 16 + 10 + 20 =$ insgesamt 70 [A + J]-Kombinationen haben sich 22 Altersreiser während der Versuchsdauer bewurzelt, 34 haben ausgetrieben, und 36, also über die Hälfte, sind abgestorben; von den 34 ausgetriebenen Reisern zeigten 15 einen Rückschlag in Form und Stellung, 5 nur in der Form der Blätter, 2 bildeten Zwischenformen aus,

die restlichen 12 behielten die Altersform bei, aber *alle diese Exemplare hatten auch keine Wurzeln gebildet*. Die Serie V ist dadurch auffällig, daß sie keinen einzigen Rückschlag, aber auch keine Spur von Bewurzelung aufwies. Die dort erzielten 10 + 10 Austriebe gingen alle nach kurzer Zeit ein. Wie erwähnt, handelte es sich bei diesen Pflanzen nicht um die Normalform von *Hedera helix*.

Abb. 4. 6 Monate alter Austrieb eines adulten Zweiges (links), der mit einem juvenilen (rechts) auf einem Wasserkulturgefäß zusammen gezogen wurde. Blattform und -stellung haben sich geändert

Abb. 5. Zwei Alterstriebe auf einem Wasserkulturgefäß, 2 Monate alt. Zuwachs mit 7 bzw. 10 Blättern unverändert

Bemerkenswert ist, daß alle jene Reiser, die zurückgeschlagen waren, Bewurzelung zeigten, während alle nicht zurückgeschlagenen der Kombination A + J auch keine Wurzeln gebildet hatten. Bei den Kontrollen A + A fand sich unter 38 Austrieben, davon *17 mit Wurzelbildung*, nur eine Zwischenform und kein einziger Rückschlag in die Jugendform.

*Tabelle 1*

A bedeutet Alters-, J Jugendform. Ein J-Reis ist jeweils mit einem A-Reis auf einem Glas vereinigt. A + A sind die Kontrollen mit zwei Alterstrieben in einem Gefäß. Das Enddatum der Aufnahme war der 12. Mai 1953. Die Pflanzen der Serie I waren zu dieser Zeit 11, die der Serie V 4 Monate alt.

| Nährlösung | Form | Gesamtzahl | Gestorben | Bewurzelt | Austrieb | Rückschlag in Form und Stellung | Rückschlag in der Form | Zwischenform | Normalform | Serie |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| v. D. Crone | A | 14 | 8 | 6 | 6 | 3 | 1 | 2 | | I |
| | J | 14 | 2 | 12 | 12 | | | | 12 | (1—24) |
| | A + A | 10 | 6 | 4 | 4 | | | | 4 | 28. 6. 52 |
| Knop | A | 10 | 4 | 6 | 6 | 5 | 1 | | | II |
| | J | 10 | 1 | 9 | 9 | | | | 9 | (25—38) |
| | A + A | 8 | 4 | 4 | 4 | | | 1 | 3 | 19. 8. 52 |
| v. D. Crone | A | 16 | 8 | 8 | 8 | 5 | 3 | | | III |
| | J | 16 | | 16 | 16 | | | | 16 | (40—59) |
| | A + A | 8 | 5 | 3 | 3 | | | | 3 | 8. 11. 52 |
| v. D. Crone | A | 10 | 6 | 2 | 4 | 2 | | | 2 | IV |
| | J | 10 | | 10 | 10 | | | | 10 | (61—80) |
| | A + A | 20 | 3 | 6 | 17 | | | | 17 | 23. 12. 52 |
| v. D. Crone | A | 20 | 10 | | 10 | | | | 10 | V |
| | J | 20 | 2 | 18 | 18 | | | | 18 | (81—110) |
| | A + A | 20 | 10 | | 10 | | | | 10 | 4. 1. 53 |
| Summe | A (+J) | 70 | 36 | 22 | 34 | 15 | 5 | 2 | 12 | 12. 5. 53 |
| | A + A | 66 | 28 | 17 | 38 | | | 1 | 37 | |

## Besprechung

Fürs erste ist zu betonen, daß in unseren Versuchen immer wenige Jahre alte Triebe der Folgeform verwendet wurden und daß es öfter die Spitzenknospen waren, die austrieben und sich dabei umwandelten. Es handelte sich also keinesfalls um schlafende Augen, denen Kranz die Fähigkeit der Rückkehr zur Jugendform vorbehalten wollte.

Wenn eine Knospe der Folgeform auf die Jugendform zurückschlägt, muß dem wohl eine Veränderung im Chemismus der Meristeme zugrunde liegen. Eine solche Veränderung wurde nicht erreicht durch Behandlung mit Indolylessigsäure und durch Begasung mit Blausäure, wohl aber durch Röntgenbestrahlung und durch Kälteschock, und, was am interessantesten ist, durch Zusammenpflanzen eines Zweigs der Alters- mit einem solchen der Jugendform in einem und demselben Wasserkulturgefäß. Um Zufallsergebnisse kann es sich kaum handeln. Wenn wir nur die Fälle zählen, in denen die Altersreiser unter Bewurzelung ausgetrieben haben, stehen in den [A + J]-Kombinationen 20 mehr oder weniger weit, davon 15 völlig umgewandelte Knospen einem einzigen nicht verjüngten Austrieb gegenüber, und in den [A + A]-Kombinationen eine einzige Zwischenform 16 unveränderten Austrieben.

Die Einwirkung des unverändert bleibenden juvenilen Sprosses auf den sich verändernden Folgeform-Trieb kann schwerlich in etwas anderem bestehen als darin, daß irgendwelche der Jugendform eigene Stoffe in der Nährlösung von der einen Zweigbasis zur anderen diffundieren. Daß solche, wohl organischen, Wirkstoffe in dem an lebenden Bakterien und Algen nicht armen Substrat längere Zeit unzersetzt bleiben sollen, erscheint zunächst überraschend, ist aber bei giftigen Substanzen, wie Alkaloiden, doch nicht undenkbar, und wie BÜNNING (1953, S. 239) ausspricht, könnten formbeeinflussende Wirkungen auch von „verhältnismäßig einfachen Stoffwechselprodukten" ausgehen.

Klarer als in unseren Versuchen ist die Sachlage in denen von DOORENBOS, auf die wir im Eingang hingewiesen haben: beim Zusammenpfropfen der beiden Wuchsformen tritt die gleiche einseitige Beeinflussung ein, die Altersform wird in die Jugendform übergeführt. Ein bedeutsamer Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen könnte uns aber einen Schritt weiterführen. Beim Pfropfen ist Bedingung für den Rückschlag das Vorhandensein von Blättern an dem jugendlichen Sproß, während die Anwesenheit von Blättern an dem Altersproß dessen Umwandlung hemmt. In unseren Versuchen waren immer beide Partner beblättert, dafür mußte der Folgeform-Zweig Wurzeln bilden, wenn die Rückkehr zur Jugendgestalt eintreten sollte; es wird jetzt zu prüfen sein, ob ein Zweig der Altersform, wenn man ihn entblättert, in der Nährlösungs-Symbiose mit der Jugendform auch ohne Bewurzelung zurückschlägt.

Aus den bisherigen Erfahrungen läßt sich folgende Arbeitshypothese ableiten. Eine für die Jugendform charakteristische Substanz wird, wie gewisse Alkaloide, vorzugsweise in der Wurzel, doch auch in den Blättern synthetisiert, und bei der normalen Reifung zur Folgeform wird diese Substanz in den Gipfeln vermindert oder gar zerstört. In genügender Menge der Altersform dargeboten, vermag die fragliche Substanz die Zurückverwandlung zum jugendlichen Status herbeizuführen; sie spielt die Rolle eines „Metaplasins", wenn wir den HARDERschen Ausdruck als Gattungsbegriff verwenden. Im Transplantationsexperiment tritt nur so viel von dem Wirkstoff in den Alterstrieb ein, daß diesem seine Blätter, die einen Antagonisten enthalten, genommen werden müssen, wenn die Umwandlung gelingen soll. In der Stecklingskultur induziert der aus dem Jugendtrieb austretende Wirkstoff in etwa entstehenden Wurzeln auf dem Weg der Autokatalyse seine eigene Bildung, und so kann ein sich bewurzelnder Alterstrieb mit dem Wirkstoff derart überschwemmt werden, daß auch vorhandene Altersblätter die Umstimmung des Spitzenmeristems nicht zu verhindern imstande sind.

Auch für das Zurückschlagen nach starkem Beschneiden (vgl. die oben mitgeteilte Beobachtung) läßt sich jetzt vielleicht eine Erklärung finden. Alte, an den Gipfeln blühende Sträucher des Efeus pflegen in

ihren unteren Teilen bewurzelte Kletterzweige zu besitzen und neu auszubilden, auch das Wurzelsystem bleibt in seiner Beschaffenheit wohl dauernd juvenil, und bei starkem Zurückschneiden der blühbaren Endtriebe kann es dazu kommen, daß den austreibenden Knospen mehr Jugend-Wirkstoff zuströmt als vor der Verstümmelung.

Ob auch die Jugendsprosse in der Wasserkultur bewurzelt sein müssen, um an den bewurzelten Alterszweigen den Rückschlag auszulösen, sollte ebenfalls noch geprüft werden, einfach dadurch, daß die dorsiventralen Triebe immer wieder durch neu geschnittene ersetzt werden, bevor sie zur Wurzelbildung gekommen sind. Es könnte ja sein, daß der Wirkstoff in der Nährlösung nicht aus der Schnittfläche des Stengels, sondern aus den intakten Wurzeln stammt.

Eine Aufgabe, die sich von selber stellt, ist die, nach dem Gegenspieler der „Jugendsubstanz" in der Folgeform zu suchen, nach dem „primären Metaplasin", wenn wir so sagen wollen, das in der normalen Periodizität der Entwicklung den Übergang von der Jugend- zur Folgeform verursacht. Und ein weiteres Ziel wäre natürlich, die fraglichen Wirkstoffe chemisch zu identifizieren. Vielleicht ist die einfache Verarmung an dem Jugend-Wirkstoff ein wesentlicher Faktor der Reifung.

Über gewisse Unterschiede, die zwischen Jugend- und Folgeform in der elementaren Zusammensetzung (Gehalt an Stickstoff, Oxalat) sowie im $p_H$-Wert und in der Transpirationsgröße bestehen, ist in der Dissertation schon einiges mitgeteilt, doch sollen diese Untersuchungen weiter ausgebaut werden (F.), bevor darüber berichtet wird.

## Zusammenfassung

Verjüngung, d. h. Zurückführung der Altersform zur Jugendform, kann beim Efeu erreicht werden durch Behandlung der Knospen mit Kälte und mit Röntgenstrahlen, aber nicht mit Indolylessigsäure und mit Blausäuregas.

Nicht nur beim Zusammenpfropfen (Doorenbos), sondern schon bei gemeinsamer Stecklingskultur in Nährlösung veranlaßt ein Jugendreis das benachbarte Altersreis beim Austreiben zum Rückschlag, doch nur wenn auch dieses Wurzeln gebildet hat; juvenile Triebe bewurzeln sich immer.

Es wird vermutet, daß ein vorzugsweise in den Wurzeln, doch auch in den Blättern (Doorenbos) der Jugendform gebildeter Wirkstoff die Umstimmung hervorruft, wenn er den Knospen der Folgeform in genügender Menge zugeführt wird.

## Literatur

Baur, E.: Einführung in die Vererbungslehre, 7.—11. Aufl. Berlin 1930. — Bruhn, W.: Beiträge zur experimentellen Morphologie, zur Biologie und Anatomie der Luftwurzeln. Flora (Jena) **101**, 98—166 (1910). — Buchenau, F.: Zur Morpho-

logie von *Hedera helix* L. Bot. Ztg **22**, 233—236, 241—245 (1864). — Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin 1953. — Doorenbos, J.: „Rejuvenation" of Hedera helix in graft combination. Proc., Kon. Nederl. Akad. Wetensch., Ser. C **57**, 99—102 (1954). — Furlani, J.: Zur Heterophyllie von *Hedera helix* L. Österr. bot. Z. **64**, 153—169 (1914). — Goebel, K.: Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen. Berlin 1908. — Goebel, K.: Organographie, 3. Aufl. Bd. I., Jena 1928. — Kranz, G.: Zur Kenntnis der wechselnden Blattformen des Efeus und ihre Ursachen. Flora (Jena) **125**, 289—306 (1931). — Molisch, H.: Pflanzenphysiologie als Theorie der Gärtnerei, 3. Aufl., Jena 1920; 4. Aufl., Jena 1922. — Tobler, F.: Die Gattung *Hedera*. Jena 1912. — Weisse, A.: Blattstellungsstudien an *Hedera helix*. Ber. dtsch. bot. Ges. **42**, 391—396 (1924). — Blattstellungsstudien an *Hedera helix*. Ber. dtsch. bot. Ges. **43**, 11—15 (1925).

Prof. Dr. O. Renner, München, Botan. Institut, Menzinger Str. 67.
Dr. H. Frank, Karlsruhe-Durlach, Haldenwangstr. 2

# Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Namen von Zwillingsautoren werden im Text der Verdeutlichung wegen durch „u." statt durch „und" verbunden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).


## Anleitung zur organischen qualitativen Analyse

Von Dr. **Hermann Staudinger**, o. ö. Professor der Chemie, Direktor des Staatlichen Forschungsinstitutes für makromolekulare Chemie in Freiburg i. Br. Sechste Auflage. Unter Mitarbeit von Dr. **Werner Kern**, o. ö. Professor für organische Chemie und Direktor des Organisch-chemischen Institutes der Universität Mainz. XII, 168 Seiten 8°. 1955. Steif geheftet DM 12.60

Aus dem Vorwort zur sechsten Auflage: Im Vorwort zur ersten Auflage wurde auf die Notwendigkeit hingewiesen, die qualitative organische Analyse in den praktischen Unterricht der organischen Chemie einzuführen, da der Studierende bei der Durchführung derartiger Analysen einen besseren Überblick über die wichtigsten Reaktionen der organischen Chemie erhält als bei der früher ausschließlich üblichen Ausbildung durch präoperative Arbeiten.

Auf diese Gedankengänge braucht heute nicht mehr eingegangen zu werden, nachdem die organische Analyse, wie das Erscheinen einer sechsten Auflage zeigt, in zahlreichen Laboratorien eingeführt ist, und nachdem auch im Ausland dieser Analysengang Eingang gefunden hat, wie aus den Übersetzungen des vorliegenden Buches ins Englische, Französische, Japanische und Spanische hervorgeht. Nachdem die zweite Auflage gegenüber der ersten vor allem durch Einführung der Tabellen am Schluß des Buches durch Herrn Dr. W. FROST eine wesentliche Erweiterung erfahren hat, wurden in den weiteren Auflagen keine prinzipiellen Änderungen mehr vorgenommen. Es wurden aber an zahlreichen Stellen Verbesserungen eingeführt und neue Methoden berücksichtigt, so in der vorliegenden Auflage die chromatographischen Methoden.

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**

# Die Physik der Hochpolymeren

Herausgegeben von **H. A. Stuart,** o. Professor für chemische Physik an der Universität Mainz. In vier Bänden.

*Im Oktober 1955 erschien:*

Dritter Band: **Ordnungszustände und Umwandlungserscheinungen in festen hochpolymeren Stoffen**

Mit 370 Textabbildungen. XVI, 693 Seiten Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 89.—

Inhaltsübersicht: **I. Teil: Ordnungszustände. Vorstufen der kristallinen Ordnung.** Von W. Kast und H. A. Stuart. — **Grundlagen der Theorie der Röntgenstreuung von Kristallgittern und Flüssigkeiten.** Von W. Kast. — **Allgemeine Struktureigenschaften vollkristalliner und amorpher fester Hochpolymerer.** Von A. G. Smekal. — **Gitterstruktur der hochpolymeren Stoffe.** Von O. Kratky, G. Porod und E. Schauenstein. — **Übermolekulare Ordnungszustände in Systemen mit kristallisierenden Fadenmolekülen.** Von W. Kast, O. Kratky, G. Porod und H. A. Stuart. — **Morphologische Strukturen bei natürlichen Fasern.** Von E. Treiber. — **II. Teil: Kristallisations- und Umwandlungserscheinungen. Allgemeine Betrachtungen.** Von A. Münster und A. J. Staverman. — **Charakteristische Erscheinungen beim Kristallisieren und Schmelzen von Hochpolymeren und ihre Deutung.** Von W. Brenschede, E. Jenckel, A. Münster und H. A. Stuart. — **Kristallisation und Molekülstruktur.** Von H. A. Stuart. — **Die glasige Erstarrung der Hochpolymeren.** Von E. Jenckel und A. Münster. — **Einfriererscheinungen und chemische Konstitution.** Von F. Würstlin. — Namen- und Sachverzeichnis.

---

Erster Band: **Die Struktur des freien Moleküls**

Allgemeine physikalische Methoden zur Bestimmung der Struktur von Molekülen und ihre wichtigsten Ergebnisse. Von **H. A. Stuart,** o. Professor für chemische Physik an der Universität Mainz. Mit 189 Abbildungen. XXI, 609 Seiten Gr.-8°. 1952. Ganzleinen DM 69.—

Zweiter Band: **Das Makromolekül in Lösungen**

Bearbeitet von **H. Buchholz-Meisenheimer, R. M. Fuoss, J. Hengstenberg, W. Jost, J. Juilfs, G. Kortüm, O. Kratky, A. Münster, A. Peterlin, G. Porod, G. Schramm, G. V. Schulz, U. P. Strauss, H. A. Stuart.** Mit 323 Textabbildungen. XX, 782 Seiten Gr.-8°. 1953. Ganzleinen DM 89.60

*In Kürze erscheint:*

Vierter Band: **Theorie und molekulare Deutung technologischer Eigenschaften von hochpolymeren Werkstoffen**

Bearbeitet von J. P. Berry, J. D. Ferry, E. Jenckel, W. Kast, H. F. Mark, W. Meskat, O. Rosenberg, F. Schwarzl, A. J. Staverman, R. S. Stein, H. A. Stuart, H. Thurn, L. R. G. Treloar, A. K. van der Vegt, F. Würstlin. Mit 367 Textabbildungen. XX, 667 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 89.—

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**


Diesem Heft liegt ein Prospekt des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany